

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli  
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

**IVA ALAČ**

**UTJECAJ NANOČESTICA CERIJA NA EMBRIONALNI RAZVOJ TRIJU MORSKIH  
JEŽINACA: *ARBACIA LIXULA*, *PARACENTROTUS LIVIDUS* I *SPHAERECHINUS  
GRANULARIS***

Završni rad

Pula, srpanj, 2018.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli  
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

**IVA ALAČ**

**UTJECAJ NANOČESTICA CERIJA NA EMBRIONALNI RAZVOJ TRIJU MORSKIH  
JEŽINACA: *ARBACIA LIXULA*, *PARACENTROTUS LIVIDUS* I *SPHAERECHINUS  
GRANULARIS***

Završni rad

**JMBAG: 0116128219, redovna studentica**

**Studijski smjer: Znanost o moru**

**Predmet: Nanotehnologija u istraživanju mora**

**Mentor: izv. prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons**

**Komentorica: dr. sc. Petra Burić**

Pula, srpanj, 2018.



## **IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, dolje potpisana Iva Alač, kandidatkinja za prvostupnicu Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Studentica: Iva Alač

---

U Puli, 13.07. 2018. godine



## **IZJAVA o korištenju autorskog djela**

Ja, Iva Alač dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom „Utjecaj nanočestica cerija na embrionalni razvoj triju morskih ježinaca: *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis*“ koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 13.07.2018.

Potpis

---

Ovaj rad, izrađen je u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa. Predan je na ocjenu Sveučilišnom preddiplomskom studiju Znanost o moru Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli radi stjecanja zvanja prvostupnice (baccalaureus) znanosti o moru.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru je za mentora završnog rada imenovao izv. prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa i za komentoricu dr. sc. Petru Burić.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Komentorica: dr. sc. Petra Burić

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Predsjednik: doc. dr. sc. Mauro Štifanić

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Mentor: izv. prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora Rovinj

Komentorica: dr. sc. Petra Burić

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora Rovinj

Članica: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Datum i mjesto obrane završnog rada: 13.07.2018.; Sveučilište Jurja Dobrile u Puli.

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Nanočestice .....	4
1.1.1. Svojstva nanočestica .....	4
1.1.2. Primjena nanočestica .....	6
1.1.3. Proizvodnja nanočestica .....	8
1.1.4. Karakterizacija nanočestica .....	9
1.2. Nanočestica u okolišu .....	10
1.2.1. Ponašanje nanočestica u okolišu .....	11
1.2.2. Agregacija i aglomeracija nanočestica .....	12
1.2.3. Utjecaj nanočestica na vodene organizme .....	15
1.2.4. Nanočestice cerija .....	18
1.2.4.1. Učinak nanočestica cerija na vodene organizme .....	20
1.3. Ježinci kao modelni organizmi u toksikološkim istraživanjima .....	21
1.3.1. Ježinac <i>Arbacia lixula</i> .....	25
1.3.2. Ježinac <i>Paracentrotus lividus</i> .....	25
1.3.3. Ježinac <i>Sphaerechinus granularis</i> .....	26
1.3.4. Test embrionalnog razvoja ježinca .....	26
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	28
3. MATERIJALI I METODE .....	29
3.1. Kemikalije .....	29
3.2. Određivanje učinka nanočestica cerijeva (IV) oksida ( $\text{CeO}_2$ ) na embrionalni razvoj tri vrste ježinaca: <i>Arbacia lixula</i> , <i>Paracentrotus lividus</i> i <i>Sphaerechinus granularis</i> .....	29
3.2.1. Sakupljanje ježinaca .....	29
3.2.2. Izdvajanje gameta ježinaca i oplodnja .....	30
3.2.3. Tretiranje embrija ježinaca <i>Arbacia lixula</i> , <i>Paracentrotus lividus</i> i <i>Sphaerechinus granularis</i> s nanočesticama cerija .....	32
3.2.4. Tretiranje sperme ježinaca s nanočesticama cerija te kvaliteta potomstva .....	33
4. REZULTATI .....	35
4.1. Određivanje uspješnosti dosezanja stadija larvi ježinaca <i>Arbacia lixula</i> , <i>Paracentrotus lividus</i> i <i>Sphaerechinus granularis</i> nakon tretiranja embrija s nanočesticama cerija .....	35
4.2. Određivanje uspješnosti oplodnje jajnih stanica spermijima prethodno tretiranim s NP $\text{CeO}_2$ i određivanje kvalitete potomstva za ježince: <i>A. lixula</i> , <i>P. lividus</i> i <i>S. granularis</i> .....	37
5. RASPRAVA .....	42
6. ZAKLJUČAK .....	45
7. LITERATURA .....	46

## 1. UVOD

Posljednjih godina svjedoči se učestaloj uporabi prefiksa „nano“ (nanoznanost, nanotehnologija, nanomaterijali). Posljedica je to ulaska na tržište sve više proizvoda koji su načinjeni od nanostrukturiranih materijala (engl. *Nanostructured Materials*, NM). Riječ „nano“ potječe od grčke riječi „nannos“ što znači „patuljak“. Predmetak (prefiks) „nano“ (oznaka n) ima značenje  $10^{-9}$  i koristi se u tvorbi decimalnih jedinica međunarodnog sustava jedinica (SI). Označava jedinicu koja je milijardu puta manja od osnovne jedinice. Ako se prefiks nano upotrijebi ispred riječi znanost, tehnologija, i sl. govori se o nanoznanosti, nanotehnologijama, koje se bave proučavanjem pojava i manipulacijom materijala, njihovom proizvodnjom i primjenom na nanoskali (1 - 100 nm). Idejnim začetnikom nanoznanosti i nanotehnologije smatra se slavni fizičar i dobitnik Nobelove nagrade za fiziku (1965. g.) Richard Feynman. Naime, Feynman je prvi previdio i iznio ideju o građenju objekata počevši od dna prema vrhu, predviđajući mogućnost manipuliranja pojedinačnim atomima i molekulama. Svoju je ideju prvi puta izložio 29.12.1959. na glasovitom predavanju održanom na Kalifornijskom institutu za tehnologiju (Caltech) pod nazivom „There's Plenty Room at the Bottom“ ili u slobodnom prijevodu „Postoji mnogo prostora na dnu“. Tom je prilikom između ostalog rekao: „Zakoni fizike, koliko ja mogu vidjeti, ne zabranjuju mogućnost manipulacije stvarima atom po atom. To nije pokušaj kršenja bilo kojeg zakona; to je nešto što se može izvesti; međutim u praksi to nije učinjeno jer smo mi preveliki. Naime, problemi u kemiji i biologiji mogu se u velikoj mjeri riješiti ako do krajnjih granica razvijemo sposobnost da vidimo što radimo, pa to radimo na atomskoj razini – smatram da je ovaj način razvoja neizbježan.“ Pojam „nanotehnologija“ prvi je 1974. godine upotrijebio prof. sa Sveučilištu za znanost u Tokiju, Norio Taniguchi, koji se bavio istraživanjem ultrapreciznih strojeva, ali je do ubrzanog razvoja moderne nanotehnologije došlo tek 1981. godine otkrićem Pretražni mikroskop s tuneliranjem (engl. *Scanning Tunneling Microscope*, STM) (Bašić i sur., 2017). Rad STM-a temelji se na fizičkoj pojavi tuneliranja elektrona između površinskih atoma uzorka i probe što omogućuje razlučivanje trodimenzionalnog profila površine na razini atoma. Upravo je to otkriće potaknulo proučavanje i razvoj novih nanostrukturiranih materijala. U makroskopskom svijetu detalji građe tvari ne ovise o njezinoj veličini, međutim kada se počne približavati

veličinama približnim veličini atoma građa postaje funkcija veličine pa oblik i veličina određuju fizikalna i kemijska svojstva.

U mikro svijetu vladaju zakoni kvantne fizike pa se i kod NM pojavljuju specifična i jedinstvena fizikalna (električna, optička, magnetska, mehanička, toplinska) i kemijska (katalitička) svojstva različita u odnosu na sirove materijale (engl. *bulk*). Zbog superiornih svojstava u odnosu na makroskopske, NM su našli široku primjenu u različitim sferama ljudskog života. Naime, čovjek je oduvijek bio izložen nanočesticama (engl. *nanoparticles*, NP) podrijetlom iz prirodnih izvora (npr. šumski požari, erupcije vulkana, pustinjska prašina i dr.). Međutim, posljednjih godina čovjek je sve više izložen i NP antropogenog podrijetla tj. onim koje su slučajno nastale npr. sagorijevanjem ili pak namjerno dizajnirane i proizvedene s nekom svrhom primjene u industriji, kozmetici ili medicini (engl. *Engineered Nanoparticles*, ENP). Do izlaganja čovjeka ili drugih organizama ENP može doći tijekom procesa njihove proizvodnje, uporabe ili skladištenja. Nanomaterijali se sve više istražuju, razvijaju i proizvode te primjenjuju u potrošačkim proizvodima. Koriste se u gotovo svim ljudskim djelatnostima: automobilskoj, vojnoj, tekstilnoj industriji, medicini, stomatologiji, farmaciji, informatičkoj tehnologiji, elektronici, poljoprivredi, građevini, i drugdje (Nel i sur., 2006). Nanočestice su pronašle primjenu i u svakodnevnoj uporabi (npr. kreme za sunčanje, paste za zube, odjeća, kao aditivi u hrani i dr.). Nanočestice mogu ući u ljudski organizam na više načina, a najčešće se to događa udisanjem, preko kože ili oralnim putem. Prema procjenama u jako prometnim područjima u zraku se može naći i do  $3 \times 10^6$  čestica/cm<sup>3</sup> (Borm i sur., 2006). Predviđena procjena globalne proizvodnje NP u periodu između 2011. - 2020. godine najveća je u području strukturalne primjene (keramika, katalizatori, kompoziti, prašci) te iznosi  $10^4$  -  $10^5$  tona godišnje. Samo za sredstva za zaštitu kože, gdje se najviše primjenjuju metalni oksidi, iznos je predviđen na približno 103 tona godišnje, dok se u području zaštite okoliša (nanofiltracija, membrane) predviđa da će proizvodnja iznositi  $10^3$  –  $10^4$  tona godišnje (Nanoscience and nanotechnologies, 2004).

Nove vrste NM, koje se svakodnevno dizajniraju usporedive su po veličini s nekim biološki značajnim strukturama (npr. DNA) i mogu stupiti u interakciju s biomolekulama, stanicama, organima i organizmima na novi i neočekivan način (RIVM Report, 2014). Uslijed nedovoljno istraženog utjecaja na zdravlje ljudi i okoliš postoje



dvojbe oko njihove primjene. Zbog sve veće proizvodnje i tendencije uvođenja na tržište novih NM, neizbježno je da određena količina ENP dospijeva u okoliš ispiranjem tla, oborinama, otpadnim vodama i na druge načine te na kraju dospijeva do riječnih, estuarijskih i morskih sustava. Pri tom se najveća koncentracija očekuje blizu gusto naseljenih područja gdje postoji velika količina nedovoljno pročišćenih otpadnih voda (Kahru i Dubourguier, 2010; Handy i sur., 2008).

Primjena postojećih i razvoj novih vrsta ENP zahtijeva odgovor na brojna, još ne odgovorena, pitanja vezana za procjenu sigurnosti upotrebe NP, njihovog utjecaja na ljudsko zdravlje i cjelokupni ekosustav. Kakav će utjecaj (pozitivan ili negativan) imati NP u interakciji s organizmima i ekosustavom ovisi o brojnim čimbenicima. Upravo zbog toga potrebno je provesti što veći broj znanstvenih istraživanja kako bi se u budućnosti mogla racionalno koristiti superiorna svojstva NM uz minimalan negativni utjecaj na zdravlje organizama i ekosustav. S tim u vidu izrađen je i ovaj završni rad.

## **1.1. Nanočestice**

Danas je opće prihvaćena definicija da su NM (nanočestice, nanocijevi, nanožice, nanokompozitni materijali i nanostrukturirane površine) one tvari koje sadrže čestice čija je barem jedna od tri dimenzije veličine između 1 – 100 nm (Bašić i sur., 2017; Ivanković, 2011; Borm i sur., 2006). Postoje različiti kriteriji po kojima se NM mogu kategorizirati: prema porijeklu, prema kemijskom sastavu, prema obliku u kojem se nalaze u prostoru, itd. Prema porijeklu NM se dijele na prirodno nastale i antropogene. Nadalje, prema kemijskom sastavu mogu se podijeliti na: organske i anorganske (Lungu i sur., 2015). Prema obliku u kojem se nalaze u prostoru, odnosno prema broju dimenzija na nanoskali, NM se dijele na: jednodimenzionalne, dvodimenzionalne ili trodimenzionalne. Nanomaterijali kod kojih je barem jedna dimenzija manja od 100 nm su: površinski filmovi, nanocijevčice, slojevi i presvlake. U NM čije su barem dvije dimenzije manje od 100 nm ubrajaju se: nanopločice, nanovlakna i nanožice. U materijale kod kojih su sve tri dimenzije manje od 100 nm spadaju: nanočestice, kvantne točke, nanoljuske, nanoprstenovi i nanokapsule (Bašić i sur., 2017). Nadalje, nanočestice se prema veličini mogu podijeliti na one dimenzije od 1 - 10 nm, od 10 - 100 nm i one preko 100 nm. Klasificiraju se i kao: ultradisperzijski sustavi (1 - 50 nm), visoko disperzijski sustavi (50 - 100 nm) ili kao sedimentirajuće čestice (100 - 1000 nm) (Lungu i sur., 2015). Po strukturnom uređenju, odnosno po stupnju prostorne uređenosti atoma, NP se mogu javljati kao nanokristali i kao amorfne NP (Tonejc, 2012).

### **1.1.1. Svojstva nanočestica**

Neovisno o tome javljaju li se kao amorfne ili kristalne strukture, NP posjeduju jedinstvene fizikalne i kemijske osobine koje se uvelike razlikuju od istih čestica mikroskopskih dimenzija (Sellers i sur., 2009). Poznato je da usitnjavanjem sirovog materijala do veličine čestica mikrometarskih dimenzija većina fizikalnih i kemijskih svojstava ostaje ista. Međutim, kada se dođe do ekstremno malih dimenzija čestica (1 - 100 nm) dolazi do velikih promjena uslijed reduciranja veličine čestica. Naime, kada čestice postanu dovoljno male počinju se podvrgavati kvantno mehaničkim zakonima. Neki od brojnih primjera promjene svojstava pri prijelazu iz „mikro“ u „nano“ svijet jesu slijedeći: bakar postaje proziran, silicij vodljiv, zlato tekuće pri sobnoj temperaturi, aluminij zapaljiv, a platina, koja je inače inertna, postaje katalizator (White, 2013).

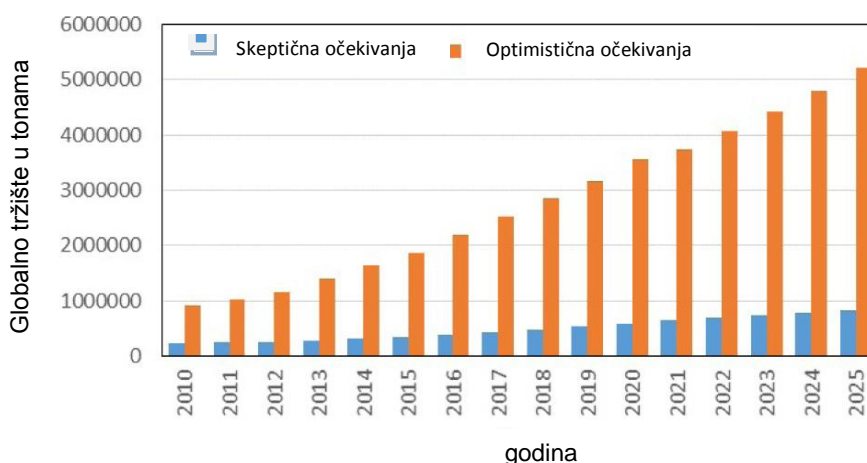
Čestice titanijeva oksida su na makro skali bijele boje, dok pri dimenzijama od oko 50 nm postaju bezbojne (Warheit, 2008). Postavlja se pitanje zbog čega se smanjenjem dimenzija do nano veličina događaju takve promjene? Poznato je da fizikalna svojstva materijala uvelike ovise o njihovoj gustoći i koordinacijskom broju (primjer modifikacije ugljika: dijamant i grafit) odnosno o međumolekulskim silama koje su kratkog dosega i koje ovisne o interakciji najbližih molekula. Kod nanokristala pojavljuje se brojčano veliki broj atoma koji se nalaze u graničnim preprekama između kristala. Najjednostavnije objašnjenje iznimno velike promjene svojstava kod NP u odnosu na sirovi materijal povezano je s činjenicom da NP imaju značajno veći broj površinskih atoma s obzirom na cijeli obujam nego mikročestice ili sirovog materijala (Tonejc, 2012). Pri promjeni dimenzije čestice od mikro do nano dimenzija mijenja se i povećava omjer površine i volumena ili površine i mase. Ako se polumjer čestice ( $r$ ) smanji s 30  $\mu\text{m}$  na 30 nm omjer površine ( $P$ ) i volumena ( $V$ ) poraste za 1000 puta ( $P/V = 3/r$ ). Kako smanjivanjem dimenzija NP raste broj površinskih slabo vezanih atoma i broj nezasićenih veznih i koordinacijskih mjesta, posljedično značajno raste i kemijska reaktivnost (Goesmann i Feldman, 2010). Tako neki materijali koji su u makro strukturi inertni postaju reaktivni. Smanjenje dimenzija čestica utječe i na njihovu čvrstinu i električne osobine. Smanjenjem dimenzija NP kvantni učinci postaju dominantan način ponašanja tvari utječući i mijenjajući optička, električna i magnetna svojstva materijala. Neposredna posljedica smanjenja dimenzija čestica je redukcija energije vezanja po atomu, što dovodi do sniženja točke taljenja.

Prelazak s mikro na nanoskalu može uzrokovati: radikalne promjene kemijske reaktivnosti, promjene u mehaničkim, magnetnim, optičkim svojstvima (npr. koloidna suspenzija NP zlata ima tamnocrvenu boju koja se mijenja prema žutoj kako raste polumjer čestica). Može doći do promjene vodljivih svojstava stoga u određenim slučajevima vodljivi materijali postaju izolatori. Nadalje, feromagnetska i feroelektrična svojstva se mogu izgubiti itd. (Balaguru, Jayaprakash, 2014).

Učinci koji se pojavljuju na nanoskali su hidrofobnost i neprijanjanje nečistoća, što je poznato kao „lotos učinak“ (Heubach i sur., 2008). Iz svega navedenog, jasno je da posebna, donedavno nepoznata i za primjenu bolja svojstva materijala dobivenih pri promjeni i smanjenju dimenzija na nanoveličine otvaraju široke tehničke i komercijalne mogućnosti njihove primjene.

### 1.1.2. Primjena nanočestica

Danas se najveći broj nanoistraživanja provodi u području nanoznanosti (Kuddus, 2017). Primjena NP se sve više širi, a proizvodnja postaje sve masovnija. Predviđanja kažu da tržište industrije NM može porasti od 3.4 do 11.8 milijardi američkih dolara u razdoblju od 2015.- 2020. godine, a predviđeni porast proizvodnje u tonama na globalnoj razini do 2025. prikazan je na Slici 1 (Trofimencoff, 2016).



**Slika 1.** Količina NM u tonama na globalnom tržištu (Pulit-Prociak i sur., 2016).

Prema količini proizvodnje u tonama NM/NP mogu se podijeliti na one koji se proizvode u velikoj količini (nanočestice silicijeva dioksida, titanijeva oksida, cerijeva oksida, aluminijska oksida, nanogлина, ugljikove nanocijevčice) i one čija je proizvedena količina znatno manja. U zadnju spomenutu kategoriju mogu se ubrojiti: kvantne točke, NP srebra, zlata, magnezijevog oksida, grafena, dendrimere, nanoceluloza, itd. Uporaba NP se proširila u gotovo sva područja od industrije svih vrsta do poljoprivrede, medicine i energetike. Nanočestice su ušle u domove i proizvode za svakodnevnu uporabu. Koriste se u kozmetici u obliku nanokristala, odnosno NP titanijeva dioksida ( $\text{TiO}_2$ ), cinkovog oksida ( $\text{ZnO}$ ), zlata, srebra i različitih nanonosača (nanoemulzije, čvrste lipidne čestice i dr.). Mogu se naći u određenim kremama za njegu kože (koloidno zlato, lipidne NP), pastama za zube (koloidno srebro,  $\text{TiO}_2$  NP), sredstvima za njegu kose (mikroemulzirana silikonska ulja) (Đekić i sur., 2013). Nanočestice  $\text{TiO}_2$  i  $\text{ZnO}$  pronašle su primjenu u sredstvima za zaštitu od sunca, a koriste se zbog velike osobine propuštanja vidljivog svjetla, a dobro apsorbiraju, za kožu opasno,

ultraljubičasto zračenje (UV). Proizvodi koji sadrže NP spomenutih vrsta su prozirni za razliku od spojeva iste vrste koji ih ne sadrže i zbog toga su privlačniji potrošačima. Osim spomenutih, u kozmetici se koriste i NP željeznog oksida kao pigment u ruževima za usne. Nadalje, u zaštiti različitih vrsta površina (mramora, betona, kamena, drva) koriste se NP koje se mogu dodati u premaz ili nanositi kao tanki filmovi i time poboljšati njihova svojstva tako da postaju lakši, trajniji, otporniji na ogrebotine, abraziju, UV i infracrveno zračenje (IR). Neki premazi imaju svojstvo samočišćenja ili su pak otporni na vlagu. Obzirom na svojstva koja se žele postići u zaštiti površina mogu se koristiti čestice: silicija, cinka, titana, aluminijska i cerijska ovisno o svrsi njihove primjene. U praksi najviše se koriste NP  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$  i  $\text{CeO}_2$ . Važna uporaba NP je u i nanokompozitnim materijalima gdje se NP integriraju u makroskopski uzorak kako bi im se osigurala bolja ukupna svojstva. Polimerni nanokompoziti su kompoziti kod kojih nanopunila ili ojačavala mogu biti ugrađena odnosno raspršena u polimerskoj matrici (npr. čestice čađe u automobilskim gumama). Od metala za sintezu NP najčešće se koriste: Al, Fe, Au, Ag, od oksida:  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{SiO}_2$ , od karbida: volfram karbid (WC), titanov karbid (TiC) i tantalov karbid (TaC). Nanočestice su osim toga svoju primjenu pronašle i u prozirnoj ambalaži u kojoj namirnice dulje zadržavaju svježinu, sportskoj opremi (tenis loptice, badminton reketi, tenisice, odjeća), kao pneumatici koji se teže zagrijevaju i lakše recikliraju, u zaštitnoj odjeći i obući koja je lakša i otpornija na habanje.

U mobilnoj telefoniji, prijenosnim računalima, uređajima za navigaciju koriste se lagane litij jonske baterije koje karakterizira relativno visok napon, energetska gustoća i dugi životni vijek. Nanočestice se koriste i u proizvodnji novih visokoučinkovitih i savitljivih fotonaponskih ćelija. Uporabom nanokristala Zn-selenida, Cd-sulfida, Pb-telurida može se smanjiti fosforescentnost i time povećati rezolucija čime se dobiva kvalitetnija slika na zaslonu ekrana (Čížmek, 2016). Široko se primjenjuju i NM od čistog ugljika (grafen, fuleren, ugljikove nanocijevice) i to posebno na polju energetike. U tiskanoj elektronici koriste se tinte koje sadrže NP srebra, bakra i u zadnje vrijeme organskih čestica. Nanokatalizatori se mogu dizajnirati tako da postignu savršenu selektivnost u katalitičkim reakcijama (Seitz i sur., 2014). Svojstva se mogu dodatno poboljšati dopiranjem metalnim ionima npr. mangana u kristalnu rešetku  $\text{CeO}_2$ . (Mužina i sur. 2018). Proizvode se i novi NM (biomimetički) koji su načinjeni tako da koriste dobre

konstrukcijske osobina iz prirode (paukova mreža, koža morskog psa, oklopi životinja itd) ili oponašaju prirodne nanostrukture. Nanomaterijali se mogu koristiti i za filtraciju i dezinfekciju vode. Za pročišćavanje i sanaciju onečišćenog okoliša i vodenih resursa koriste se ugljikove nanocjevčice (visoka adsorpcijska moć) i NP elementarnog željeza (antimikrobna aktivnost). Koristeći dendrimere učinkovito se mogu ukloniti virusi, bakterije i suspendirane organske i anorganske tvari molekulskih masa manjih od 3000 Da. Za inaktivaciju mikroorganizama koristi se ionizirano nanosrebro i oksidi metala npr.  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{MgO}$  i dr. (Bašić i sur., 2017). Najznačajnija buduća primjena NP očekuje se u području biomedicine i zdravstva, optike i elektronike. U novim inovativnim tehnikama u zdravstvu očekuje se da će NP poslužiti kao nosači ljekovite tvari, bilo da je lijek kemijski vezan za nosač, ili da stvaraju supramolekulske komplekse s molekulama lijeka (dendrimere) (Perrie i Rades, 2012; Mathiowitz, 2008).

### **1.1.3. Proizvodnja nanočestica**

Reducirajući veličinu sirovog materijala ili pak spajanjem atoma i molekula u veće strukture mogu se tehnički proizvoditi, dizajnirati odnosno „krojiti“ NP. Iako postoje različite sistematizacije procesnih tehnika u proizvodnji NP najčešće se govori o dva osnovna principa proizvodnje NP. To su metoda proizvodnje odozgo prema dolje (engl. *top down*) i odozdo prema gore (engl. *bottom up*). Metoda proizvodnje NP odozgo prema dolje odvija se tako da se makroskopski materijal različitim postupcima usitnjava do nanorazine. Ta se metoda temelji na uklanjanju površinskih atoma ili njihovih agregata s površine. Pri tom se materijal može mehanički usitnjavati visokoenergetskim mljevenjem, kavitacijom, drobljenjem, udarom, sječenjem ili trenjem. Mogu se koristiti i različiti mehanokemijski procesi. U metode odozgo prema dolje ubrajaju se i različite tehnike litografije. Neke od litografskih metoda koje se koriste u proizvodnji NP su: litografija elektronskim snopom (engl. *Electron beam lithography*, EBL), usitnjavanje materijala pomoću fokusiranog ionskog snopa (engl. *Focused ion beam*, FIB), optička ili foto litografija, litografija ultraljubičastim zračenjem (UV litografija), litografija rendgenskim zračenjem, litografija nanoutiskivanjem i dr. Sve navedene metode baziraju se na dobivanju NP na način da se kompaktan, sirovi materijal usitnjava sve do nanodimenzija. Kod navedenih „*top down*“ metoda pojavljuju

se nesavršenosti u površinskoj strukturi proizvedenih NP što u konačnici može dovesti do značajne promjene u fizikalnim i kemijskim svojstvima (npr. smanjenje vodljivosti).

Odozdo prema gore metoda sinteze, bazira se na „građenju“ na način da se međusobno povezuju atomi ili molekule u kompleksnije strukture sve do nanodimenzija. Materijali se slažu atom po atom, molekula po molekula ili nakupina po nakupinu (engl. *cluster*). Kod „bottom up“ tehnika, za razliku od „top-down“ tehnika, veća je vjerojatnost da će dobivene NP imati manje grešaka te posjedovati homogenija svojstava. Primjeri sinteze nanostrukture odozdo prema gore su: kristalizacija i precipitacija, sol-gel proces, pripreme koloidnih suspenzija, mikroemulzijska sinteza čestica i dr. U ovu grupu se ubraja i kondenzacija inertnim plinom (engl. *inert gas condensation*, IGC), elektrodpozicija (engl. *electro-deposition*, ED) i magnetronsko prskanje (engl. *magnetron sputtering*). Za kontrolu kvalitete sintetiziranih NP i za manipuliranje na nanorazini mogu se koristiti sljedeći mikroskopi: mikroskop atomskih sila (engl. *atomic force microscope*, AFM), mikroskop za ispitivanje sondom (engl. *scanning probe microscope* - SPM), STM i dr.

#### **1.1.4. Karakterizacija nanočestica**

Kako bi se u razmatranje uzela moguća toksična svojstva pojedinog nanomaterijala (NM) te kako bi se procijenio njegov utjecaj na okoliš, potrebno ga je karakterizirati tj. odrediti njegova fizikalno-kemijska svojstva. U usporedbi sa sirovim materijalom, kao što je već opisano, NM može posjedovati promijenjene ili neke dodatne osobine proistekle iz povećanog omjera između površine i volumena ili zbog iskazanih kvantnih učinaka koji se pojavljuju na nano razini. Nanočestice se mogu karakterizirati na način da im se odredi jedan ili više od slijedećih parametara: sastav, oblik i veličina primarnih čestica, omjer površine i volumena (engl. *aspect ratio*), specifična površina (omjer površine i mase), raspodijela veličine čestica, stupanj agregacije/aglomeracije, površinski naboj (zeta potencijal<sup>1</sup>), katalitička aktivnost, funkcionalne grupe, kristalna struktura, topljivost, točka taljenja, itd. Budući da postoji veliki broj svojstava kojima se mogu karakterizirati NP, postoji i velik broj metoda i uređaja koji se primjenjuju u

---

<sup>1</sup> Potencijal difuznoga sloja iona oko nabijene koloidne čestice. Visok zeta potencijal znači manju agregaciju.

njihovoj karakterizaciji. Svaka metoda pruža samo djelomičnu karakterizaciju materijala, a situacija je dodatno otežana u kompleksnim prirodnim sustavima gdje su razlike u primijenjenim metodama izraženije. Osim toga različite metode mogu dati bitno različite rezultate, a konačno svojstvo uvelike ovisi o interpretaciji stručnjaka (Meermann i sur., 2016).

Nanočestice se mogu ispitati s obzirom na način kako reagiraju na fotonska zračenja (npr. rendgenska, infracrvena, ultraljubičasta, itd.), elektrone ili ione te analizirajući dobivene podatke. Temeljni podaci o načinu identifikacije tvari mogu se pronaći u aneksu VI uredbe EU akronima REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical") koja je na snazi od 1. lipnja 2007. godine.

Za anorganske NP stabilizirane ligandom može se koristiti transmisijaska elektronska mikroskopija (engl. *transmission electron microscopy*, TEM) kako bi se definirale jezgre NP, mikroskopijom atomskih sila mogu se dobiti podatci o ukupnoj dimenziji jezgre i ljuske NP dok masena spektroskopija s induktivno spregnutom plazmom (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) služi za određivanje sastava NP (von der Kammer i sur., 2012).

Optička svojstva i veličina NP mogu se odrediti uporabom vidljive svjetlosti i ultraljubičastog područja (engl. *ultraviolet-visible* UV-Vis) spektroskopije, a veličinu čestica u suspenziji moguće je odrediti metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS).

## **1.2. Nanočestica u okolišu**

Zajedno s razvojem nanotehnologije i povećanom proizvodnjom NM raste i zabrinutost o mogućim štetnim učincima istih na ljudsko zdravlje i okoliš. Zabrinutost je potencirana nepotpunim znanjem o putovima ulaska i interakcije NP s organizmima i okolišem. U pojedinim potrošačkim proizvodima NP su čvrsto ugrađene u čvrsti ili tekući materijal matrice. U slučaju tako sintetiziranih NP postoji mala mogućnost njihovoj izloženost i stoga je toksikološki rizik za okoliš i organizme nizak. To se, međutim, može promijeniti kad NM dospije u odlagalište, postrojenje za spaljivanje ili recikliranje otpada ili tijekom uporabe dođe do njegovog habanja, odnosno abrazije, što rezultira otpuštanjem NP u okoliš. Tada se opasnost za okoliš i organizme povećava jer puno veći problem od



„vezanih“ NP predstavljaju izolirane, slobodne NP koje svakodnevno završavaju u zraku, tlu, vodi ili živim organizmima (Ivanković, 2011).

Iz raznih tvornica NP mogu dospjeti u atmosferu iz koje putem oborina završavaju na tlu ili u otpadnim vodama te tako dopijevaju u rijeke, jezera i mora. Mehanizmima pročišćavanja otpadnih vode ne može se postići potpuno uklanjanje NP, koje se i nakon pročišćavanja u njoj zadržavaju i na kraju dopijevaju u vodeni okoliš. Kako se NP koriste i kao aditivi za goriva (dizel), izgaranjem goriva izravno se ispuštaju u atmosferu. NP koje se nalaze u zraku predstavljaju jedan od najvećih problema za okoliš i zdravlje jer ih je moguće udahnuti, mogu prijeći velike udaljenosti od mjesta ispuštanja te se brzo i lako se prenose prostorom. Nadalje, nanočestice koje se koriste u proizvodima u domaćinstvu nakon primjene, otpadnim vodama putem kanalizacijskih ispusta opet dopijevaju u okoliš. Izravan unos NP u rijeke i mora može se dogoditi i korištenjem premaza protiv obraštanja brodova koji sadrže NP.

### **1.2.1. Ponašanje nanočestica u okolišu**

Nanočestice se pojavljuju kao nova vrsta zagađivala s negativnim ekotoksikološkim utjecajem na okoliš i morski ekosustav upravo zbog toga što mogu različitim vodenim putevima dospjeti u more. Na ponašanje NP u okolišu utječu fizikalno-kemijska svojstva samih NP, kao i medij u koji dopijevaju. Svojstva NP koja treba uzeti u obzir pri procjeni opasnosti za okoliš su: veličina i oblik čestica, kemijski sastav, struktura, aglomeracijska/agregacijska svojstva, topljivost te njihova površinska svojstva (omjer površine i volumena, površinski naboj, prisutnost funkcionalnih grupa) (Warheit i sur., 2008). Osim tih svojstava važna je i biološka postojanost, hidrofilnost/hidrofobnost, optička svojstva, paramagnetska svojstva itd. Osobine medija koje imaju značajan utjecaj na ponašanje NP su: ionska jakost, pH, salinitet, prisutnost prirodne organske tvari (engl. *natural organic matter*, NOM) i dr. NP otpuštene u okoliš doživljavaju brojne transformacije koje ovise o okolišnim uvjetima od kojih su najvažnije agregacija, topljivost, adsorpcija NOM-a ili bioloških makromolekula, fotodegradacija i biodegradacija (Bottero i Wiesner, 2010).

Umjetno proizvedene NP u morskoj vodi ponašaju se drugačije nego li u slatkoj stoga je i njihova toksičnost u morskoj vodi različita od ponašanja u slatkoj vodi čak i pri

velikim razrjeđenjima (Matranga i Corsi, 2012). Naime, NP u trenutku dospijevanja u okoliš visokog saliniteta, kao što je more, agregiraju, odnosno aglomeriraju s tvarima prisutnima u takvom okolišu. Kako bi se što bolje razumjelo ponašanje NP u okolišu od ključnog je značaja poznavanje kemijskih svojstava same površine NP koja prva stupa u interakciju s okolišem u kojem može reagirati s nizom molekula prirodno prisutnih u vodi ili sedimentu, ali i s organizmima. Čak i najjednostavnije NP imaju površinska kemijska svojstva značajno različita od unutrašnjosti čestice, njezine jezgre (Christian i sur., 2008). Upravo zbog toga omjer površine i volumena predstavlja jedan od najznačajnijih parametara koji utječu na njihovo ponašanje u okolišu. Čestice manjih dimenzija imaju veći omjer površine u odnosu na volumen što uzrokuje promjene njihovih svojstava (točka taljenja, katalitička svojstva, vodljivost, topljivost i dr.). Kako će se NP ponašati u okolišu ovisi i o tome jesu li čestice „gole“ ili imaju na sebe dodatno vezan omotač. Na NP se mogu vezati primjerice inertni metali, oksidi, razni polimeri i drugi spojevima čime se selektivno može utjecati na njihova svojstva. Omatanjem čestica može im se osigurati dodatna funkcionalnost i stabilnost. Gole NP pokazuju manju disperzijsku stabilnost od onih koje su stabilizirane funkcionalnim grupama. Omotač se može proizvesti tako da površina čestica bude nabijena kako bi se osiguralo da ostanu raspršene u tekućem mediju, tj. kako NP ne bi agregirale i precipitirale i time izgubile svoja specifična svojstva (Christian i sur., 2008). Osim toga, omotač izravno utječe na interakciju čestica u vodenim sustavima i na njihovu moguću toksičnost prema organizmima s kojima dođu u neposredan kontakt.

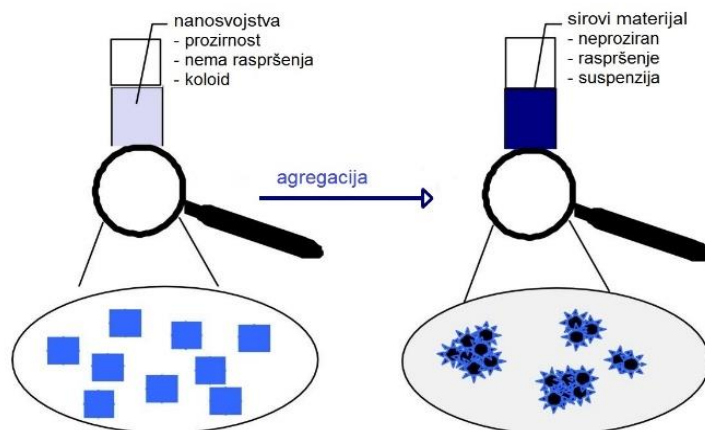
### **1.2.2. Agregacija i aglomeracija nanočestica**

Jednom kada se NP nađu u vodenom stupcu o njihovoj disperzijskoj stabilnosti ovisi koliko će vremena u njemu ostati. Nestabilnost može biti uzrokovana agregacijom zbog nedostatka statičke ili steričke stabilizacije NP, rekristalizacije i Ostwaldovog zrenja koje se javlja zbog razlike u topivosti čestica različite veličine (Du i sur., 2015). U vodenom stupcu ponašanje čestica određeno je Brownovim gibanjem i hidrodinamičkim tokovima koji izazivaju koloidno prenošenje čestica kroz vodeni stupac u kojem NP mogu stupiti u interakciju s prisutnim pelagičkim organizmima. Na NP djeluje i gravitacijska sila koja je usmjerena prema dolje i izaziva njihovo taloženje, zatim sila uzgona koja ovisi o obliku i veličini čestica (volumenu čestica) i gustoći medija. U estuariju i moru, tj. u područjima visokog saliniteta, NP teže agregaciji i

sedimentaciji kako bi smanjile svoju visoku površinsku energiju. Nanočestice se nakupljaju u sedimentu ili se pak zadržavaju na njegovoj površini gdje mogu stupiti u interakciju s bentoskim organizmima (Bour i sur., 2015). Što je koncentracija NP veća, veći je i stupanj njihove agregacije. Razlika između agregacije i aglomeracije je u tome što kod agregacije djeluju snažne kemijske sile koje povezuju tvari tvoreći agregate, a kod aglomeracije djeluju slabe sile koje povezuju tvari tvoreći aglomerate. Kako su sile među česticama slabije, disperzija se lakše događa kod aglomeriranih nego kod agregiranih čestica (Tso i sur., 2010). U vodenom stupcu van der Waalsove i elektrostatske sile uvjetuju stabilnost NP u vodenom okolišu (Lyklema, 2005; Lead i Wilkinson, 2006). Na sposobnost aglomeracije, odnosno agregacije osim koncentracije NP utječu i drugi čimbenici kao što su oblik i veličina čestica, već spomenuti površinski naboj itd. Na agregaciju/aglomeraciju i disperziju NP utječu i uvjeti koji vladaju u okolišu kao što su: ionska jakost, pH medija, salinitet, prisutnost NOM-a itd.

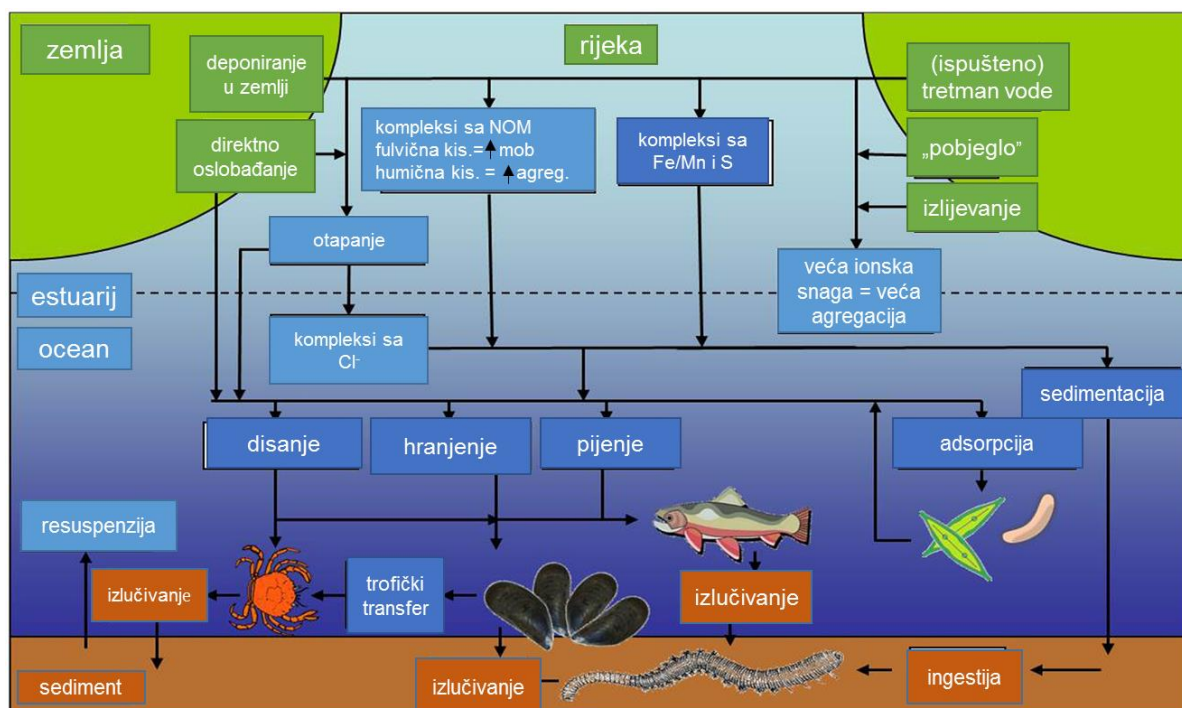
Topljivost NP značajan je čimbenik, s obzirom da topljive molekule lakše ulaze u okolinu i biološke sustave. Poznavanje brzine otapanja NP u vodenim sustavima bitno je za procjenu toksikoloških učinaka. Stupanj topljivosti ovisi o vrsti čestica, njihovoj veličini i obliku, omotačima i svojstvima samog medija. Tako se primjerice štapičasti oblik NP pokazao toksičnijim u usporedbi sa sferičnim oblikom čestica (Baalousha i sur., 2012).

Agregiranim NP smanjuje se površina, a time i mogućnost raspršivanja. Jednom kada NP agregiraju i precipitiraju, gube svoja specifična svojstva, što je zorno prikazano na Slici 2. (Christian i sur., 2008). Što je veći salinitet i ionska jakost medija, to se više smanjuje negativnost elektroforetske mobilnosti što također pogoduje agregaciji čestica (Batley i sur., 2013.)



**Slika 2.** Utjecaj agregacije na svojstva nanočestica (Borm, 2006).

Penjući se ili spuštajući po trofičkoj piramidi tj. prolazeći kroz trofičke lance možemo zaključiti da su svi organizmi (bentoski i pelagički) direktno ili indirektno u kontaktu s NP putem hrane, sedimenta ili iz samog vodenog stupca (Slika 3). Bioturbacijom i resuspenzijom NP iz sedimenta one su dostupne vodenim organizmima te se u njima nakupljaju i prenose kroz hranidbeni lanac u moru. U hranidbenom lancu može doći i do biomagnifikacije NP u organizmima. Evaporacijom morske vode i putem aerosola NP dopijevaju u atmosferu te oborinama opet u more čineći tako konstantno cirkuliranje NP, ne izostavljajući pri tome žive organizme, vodu, zrak i kopno.



**Slika 3.** Izvori ispuštanja NP, njihovo ponašanje, potencijalni put unosa u organizme morskog ekosustava (Baker i sur., 2013)

### 1.2.3. Utjecaj nanočestica na vodene organizme

Broj istraživanja koja su proučavala utjecaj NP na žive organizme bio je do nedavno veoma ograničen (Ivanković, 2011), međutim zadnjih nekoliko godina, kako raste svijest o mogućim štetnim učincima NP, broj radova o ekotoksičnosti NP u eksponencijalnom je porastu. Posljedično raste i broj istraživanja utjecaja NP na vodene organizme. Naime, 2008. godine samo 18% radova od ukupnog broja objavljenih radova vezanih za vodene ekosustave bilo o morskim ekosustavima, dok je 2014. taj broj porastao na 38% u odnosu na slatkovodne sustave (Canesi i Corsi, 2016). Od svih ispitivanih morskih organizama najviše istraživanja obavljeno je na školjkašima (40), dok je o utjecaju NP na morske ježince objavljena samo osam radova (Canesi i Corsi, 2016). Jednom kada nanočestice dopiju u vodeni ekosustav na njihovu sudbinu, pa tako i biodostupnost u vodenom okolišu utječu njihova fizikalno-kemijska svojstva (posebno visoka reaktivnost) i svojstva samog medija u kojem se nalaze. U interakciji s biološkim sustavima NP mogu izazvati različite odgovore organizma poput oksidacijskog stresa, upalnih procesa, genotoksični učinak ili staničnu smrt. Nanočestice mogu u stanicu ući endocitozom, difuzijom kroz stanične membrane ili ionskim transportnim putovima, nakon čega se mogu raspodijeliti po cijelom tijelu.

Istraživanje na slatkovodnim vrstama: vodenbuhi *Daphnia magna* i larvi dvokrilca *Chironomus riparius* pokazalo je da NP  $\text{CeO}_2$  uzrokuju genotoksični učinak, odnosno uzrokovale su oštećenje DNA (povećan broj lomova DNA), dok se isti učinci nisu primijetili pri izlaganju NP  $\text{TiO}_2$  i  $\text{SiO}_2$  (Lee i sur., 2009). Pregled učinaka NP na vodene organizme prikazan je u Tablici 1 (Matranga i Corsi, 2012).

Budući se u posljednjih nekoliko godina značajno povećala upotreba NP metala i metalnih oksida u suvremenim proizvodima neizbježno je da će takva vrsta NP pronaći put do vodenih sustava. Njihova vjerojatna sudbina je heteroagregacija s prirodno prisutnom organskom tvari i/ili slobodnim anionima, nakon čega dolazi do sedimentacije odnosno taloženja čestica. U morskim sustavima mikroorganizmi mogu apsorbirati metalne NP s mogućnošću prijenosa u više organizme trofičkog hranidbenog lanca. Smatra se da su filtratorski organizmi najviše izloženi riziku negativnog učinka NP.

**Tablica 1.** Toksični učinci NP na morske organizme (Matranga i Corsi, 2012).

Vrsta NP	Organizam	Uvjeti izlaganja	Učinak
TiO <sub>2</sub> (10 nm)	Cyanobacteria ( <i>Anabaena variabilis</i> )	24 h - 6 dana 0.5 - 250 mg/L	C i N ciklus: smanjena aktivnost N fuzije  Vremenska i koncentracijska ovisnost intracelularnih razina dušikom bogatih cijanoficinskih grana proteina (engl. <i>nitrogen rich cyanophycingrana proteins</i> , CGP). Veća ovisnost o vremenu izloženosti nego o koncentraciji NP
TiO <sub>2</sub> (15 - 20 nm)  ZnO (20 - 30 nm)	fitoplankton  (Dijatomeje - <i>Skeletonema marinoi</i> i <i>Thalassiosira pseudonana</i> ; <i>Chlorophyceae</i> - <i>Dunaliella tertiolecta</i> ; <i>Prymnesiophyceae</i> - <i>Isochrysis galbana</i> )	24 h - 96 h  0,10, 100, 500,  1000 mg/L	TiO <sub>2</sub> ne utiče na brzinu rasta  ZnO usporava brzinu rasta ZnO (uzrokuje nekrotični enterokolitis)
TiO <sub>2</sub> ( 23.2 nm)  C- nanocijevi (vanjski promjer 1 - 2 nm, duljina 0.5 - 2 mm)	crv <i>Arenicola marina</i>	subletalno OECD/ASTM  1990 test akutne toksičnosti TiO <sub>2</sub> (1 - 3 g/kg)  C- nanocijevi (0.003 - 0.3 g/kg)	TiO <sub>2</sub>  Porast staničnih oštećenja (negativna regulatorna regija receptora ) (engl. <i>negative regulatory region of the receptor</i> )  DNA oštećenja u koelomocitima  LOEC 1 g/kg  C- nanocijevi nisu bile unesene u organizam i nisu pokazale nikakav učinak do 0.03 g/kg
NCB (bentonit) (1312) nm	Hemociti Mediteranske dagnje  <i>Mytilus galloprovincialis</i>	1,5,10 µg/mL	Nema uticaja na NRR  Povećanje ekstracelularnog otpuštanja lisosoma  Značajne promjene u mitohondrijskim parametrima, inducirani upalni odgovor
TiO <sub>2</sub> (22 nm)  C <sub>60</sub> (0,6 nm)  SiO <sub>2</sub> (12 nm)	Hemociti Mediteranske dagnje  <i>Mytilus galloprovincialis</i>	1,5,10 µg/mL	Nema utjecaja na NRR, otpuštanje lisosoma ovisno o konc., ekstracelularno stvaranje dušikovog oksida
C <sub>60</sub> (0.7 nm)  TiO <sub>2</sub> (22 nm)  SiO <sub>2</sub> (12 nm)	Mediteranska dagnja  <i>Mytilus galloprovincialis</i>	0.05, 0.2, 1 i 5 mg/L	Promjene u lizosomskim i biomarkerima oksidacijskog stresa u hepatopankreasu, NRR reduciran u hemocitima i probavnim žlijezdama. Katalaze (CAT) sve više
C <sub>60</sub> (33 nm)	Kamenica <i>Crassostrea virginica</i>  Embrio, Odrasle jedinke hepatopankreasne stanice	1, 10, 100, 500 µg/mL	<10 µg/mL utječe na razvoj embrija i destabilizaciju lisosoma, C <sub>60</sub> se nakuplja u hepatopankreasnim stanicama i lokalizira u lizosomima
C <sub>60</sub>	Veslonožac <i>Hyalella azteca</i>	Test akutne toksičnosti	Nema akutne toksičnosti do 7mg/L

		96 h (7 mg/L)	
Nanoprah grafena (engl. <i>Graphene Nano-Platelet</i> , GNP) (15 nm)	Plava školjka ( <i>Mytilus edulis</i> )	24 h	GNP se nakupljaju u probavnom traktu  Umjerena razina oksidacijskog stresa
SiO <sub>2</sub>  (staklena vuna)	Plava školjka ( <i>Mytilus edulis</i> )	12 h, 1, 2, 4, 8 i 12 dana	Apsorpcija i nakupljanje u hepatopankreasu  Ozbiljne ozljede stanica i oksidativni stres Smanjenje NRR (12 h)  Akumulacija lipofuscina  Povećanje fagocitoze kod granulocita, autofaga i na kraju apoptoza epitelnih stanica šupljine i probavnih tubula
TiO <sub>2</sub> (<10 nm)	Morski puž  ( <i>Haliotis diversicolor supertexta</i> )	Test akutne toksičnosti  96 h (0.1-10mg/L)	Oksidacijski stres, aktivnost enzima superoksid dismutaze značajno porastao (1 mg/L), reducirani glutation se smanjuje (1 mg/L)  Lipidna peroksidacija ovisna o porastu doze
TiO <sub>2</sub> (<10 nm)  (zajedno s TBT)	Morski puž ( <i>Haliotis diversicolor supertexta</i> ) embriji	2, 10, 50 i 250 mg/L	>10 mg/L inhibicija lučenja i malformacije  2 mg/L zajedno s TBT (tributil kositar) povećalo toksičnost 20 puta
CuO (10 -100 nm)  (ioni Cu)	Morski crv ( <i>Hediste diversicolor</i> )  školjkaš ( <i>Scrobicularia plana</i> )	16 dana  7 dana	Smanjenje sposobnost bušenja rupa (samo za topljivi Cu) Promjene uobičajenog ponašanja  Protein sličan metalotioneinu povećavao je biomarkere oksidacijskog stresa
Ag (65 - 30 nm)	Morski biofilm	24 h  (0 - 2000 mg/L)	Značajno smanjenje volumena i biomase  Unos ovisan o koncentraciji
SnO <sub>2</sub> (~ 61 nm)  CeO <sub>2</sub> (50 -105 nm) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (20 - 30 nm)	Ježinac ( <i>Paracentrotus lividus</i> )	5 dana	Smanjena aktivnost kolinesteraze Smanjena razina proteina HSC70 i razina proteina GRP78  Morfološko oštećenje lisosoma

Posebno su ugroženi školjkaši s dvije ljuštore kod kojih se NP akumuliraju u sluzi. Bentoski organizmi hranom unose istaložene NP, pa tako primjerice kod riba nakon unosa tih organizama zajedno s NP, iste dospijevaju u crijeva nakon čega se mogu transportirati i nakupljati u različitim organima i tkivima. Čestice nakupljene u sluzi mogu utjecati na respiratorne procese i transport iona. Oksidacijski stres izazvan NP zabilježen je kod mnogih organizmima što u konačnici može rezultirati kroničnim utjecajem na zdravlje (Baker i sur., 2013). Nakon izlaganja sperme ježinca *P. lividus*

NP srebra, kobalta i titanijevog oksida nije uočen nikakav utjecaj na oplodnju gameta (Gambardella i sur., 2014), dok su za vrstu *Strongylocentrotus droebachiensis* nakon izlaganja NP Ag stanice blastule bile vakuolizirane i bez oblika (Magesky i sur., 2015). Nedavna istraživanja na ježincima i dagnjama pokazala su da su NP Ag toksične za promatrane vrste te da se prilikom ispitivanja toksičnosti u obzir moraju uzeti veličina i oblik NP kao i trenutak kada organizam dolazi s njima prvi puta u doticaj (Burić, 2018; Burić i sur., 2015).

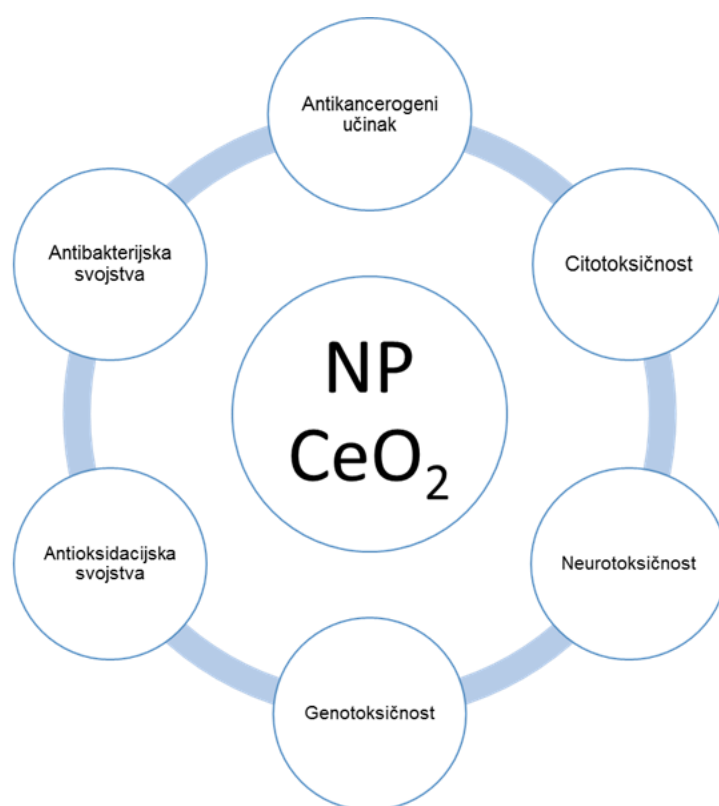
#### **1.2.4. Nanočestice cerija**

Osobine i svojstva cerija drastično se mijenjaju kada s makro skale pređe na nanodimenzije. NP CeO<sub>2</sub> među najznačajnijim su NP i našle su iznimno široku uporabu kao komercijalno vrijedan materijal. Na željena nanosvojstva može se utjecati izborom metoda pripreme, veličinom i oblikom čestica te površinskom kemijom. Dokazano je da veličina NP cerija između 2 - 3 nm osigurava najveću reaktivnost i termodinamičku stabilnost (Reed i sur., 2012). NP CeO<sub>2</sub> posjeduju slijedeća svojstva: izrazit katalitički potencijal, veliku mogućnost apsorpcije UV zračenja, visok indeks loma i visoku prozirnost u području vidljive svjetlosti, stabilnost na visokim temperaturama, veliku tvrdoću i reaktivnost, poluvodička, feromagnetna, luminiscentna i baktericidna svojstva te mogućnost „pohrane“ velike količine kisika. Zbog navedenih svojstava NP CeO<sub>2</sub> koriste se za: kemijsko-mehaničko poliranje u optičkoj i elektrooptičkoj tehnologiji, u industrijskoj katalizi, kao dodatak dizel gorivu, za zaštitu od korozije te u elektrokemijskim uređajima. Nadalje, upotrebljavaju se kao plinski senzori, dodatak staklima za postizanje željenih svojstva, u premazima za zaštitu od UV zračenja, kao dodatak keramičkim materijalima i pigmentima za boje, služe kao materijal za poliranje stakla i luminiscentni materijal (Reed i sur., 2012; Gulicovski, 2016). Koriste se u kozmetičkoj industriji, konzumnim proizvodima i u visokoj tehnologiji (Rajeskumar, 2017). U posljednje vrijeme sintetiziraju se i dizajniraju biomaterijali i biomolekularni materijali na bazi CeO<sub>2</sub> koji su kompatibilni s ljudskim tkivima. Pa su stoga NP CeO<sub>2</sub> primjenu pronašle i u medicini, stomatologiji i farmaciji. U području medicine naročito u regenerativnoj medicini i onkologiji. Istraživanja su pokazala da su NP CeO<sub>2</sub> prirodno toksične za neke stanice karcinoma i koriste se za suzbijanje diobe stanica tumora (Wason i Zhao, 2013). Osim toga, NP cerija mogu maligne stanice načiniti „osjetljivim“ na zračenje koje ih ubija, a da se pri tom ne oštete okolne zdrave stanice. NP CeO<sub>2</sub>



mogu kontrolirati redukcijsko-oksidacijski status stanice te se mogu primjenjivati kod bolesti kod kojih su razine reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) postale nekontrolirane (karcinom, dijabetes, arterioskleroza, neurodegenerativne bolesti i dr.) (Bailey, 2003). U novije vrijeme NP CeO<sub>2</sub> nalaze primjenu i u medicinskoj dijagnostici kao i u biomedicinskim istraživanjima kao potencijalni agens koji sprečava starenje stanica (Beverly i Rzigalinski, 2005). Dokazano je da NP CeO<sub>2</sub> štite od zračenja, oštećenja stanica izazvanog toksinima, neuroloških poremećaja, te da se NP CeO<sub>2</sub> ponašaju kao prirodni enzimi i potencijalno se mogu primijeniti kao antioksidansi (Korsvik i sur., 2007; Heckert i sur. 2008; Pirmohamed, 2010; Culcasi, 2012). „Gole“ čestice nanocerija su slabo topljive što komplicira njihovu biološku uporabu. Shema primjena nanocerija u području biomedicine i zdravstva dana je na Slici 4.

Iz svega navedenog vidljivo je da se nanocerij široko primjenjuje i da će se područje njegove primjene i dalje širiti. Procjenjuje se da je globalna godišnja proizvodnja nanocerija 10 000 tona (Reed i sur., 2012). Tako velika količina NP cerija može potencijalno predstavljati opterećenje za okoliš. Naročito zabrinjava velika koncentracija NP cerija koje se oslobađaju sagorijevanjem dizel goriva.



**Slika 4.** Primjena nanocerija (Rajeshkumar i Naik, 2017).

#### 1.2.4.1. Učinak nanočestica cerija na vodene organizme

Ispitivanje učinak NP cerija na vodene organizme od iznimnog je značaja iz razloga što se, kao što je u radu do sada izloženo, cerij široko primjenjuje i velika je količina NP cerija koja može završiti u okolišu. NP CeO<sub>2</sub> pripadaju skupini ENP zajedno s NP: Ag, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub> i dr. za koje se smatra da predstavljaju najveću prijetnju za okoliš i organizme koji u njemu žive (Pinsino i sur., 2015). U dosadašnjim istraživanjima utjecaja NP cerija na vodene organizme još su 2006. godine otkrivene NP CeO<sub>2</sub> na površini stanične stijenke bakterije *Escherichije coli*, ali se nije uspjela dokazati njihova prisutnost unutar stanice (Thill i sur., 2006). Genotoksične i ekotoksikološke procjene utjecaja NP CO<sub>2</sub> provedene su na slatkovodnom planktonskom račiću *Daphnia magna* i larvi vodene mušice *Chironomus riparius*. Dokazano je da NP CeO<sub>2</sub> mogu izazvati genotoksične učinke (oštećenje DNA) na obje vrste te je utvrđena statistički značajna korelacija između oštećenja DNA i smrtnosti *C. ripariusu*, što u konačnici ukazuje na moguću genotoksičnost NP CeO<sub>2</sub> prema vodenim organizmima (Lee i sur., 2009). Na slatkovodnoj mikroalgi *Pseudokirchneriella subcapitata* ispitivana je ekotoksičnost i stabilnost NP CeO<sub>2</sub> stabiliziranih poliakrilnom kiselinom (engl. *poly (acrylic acid)*, PAA) u prisustvu/odsustvu NOM-a. Rezultati su pokazali da prisutnost NOM-a ne utječe na agregaciju PAA-CeO<sub>2</sub>. Povećana stabilnost NP uzrokuje povećanu toksičnost (oksidativni stres) što je uočeno kod alge *P. subcapitata* (Booth i sur., 2015). Na dvije vrste mikroalgi: *Dunaliella salina* (bez stanične stijenke) i *Chlorella autotrophica* (sa stijenkom) ispitivano je predstavlja li stanična stijenka zaštitnu barijeru ili NP međudjeluju s njom. Korišteni su srebro i cerij u ionskom obliku i kao nanočestice te se ispitalo postoji li toksičniji učinak iona ili nanočestica. Indikatori toksičnosti bili su: gustoća, vijabilnost, veličina i kompleksnost stanica, autofluorescencija klorofila, količina ROS-ova itd. Rezultati su pokazali da su Ag i CeO<sub>2</sub> u ionskom i NP obliku utjecali na reproduktivne, strukturne i fiziološke mehanizme obe vrste mikroalgi. Došlo je do smanjenja aktivnog klorofila i gustoće stanica, a povećala se složenost stanica i količina ROS-ova. Ionski oblik bio je toksičniji od nanočestičnog za Ag i za CeO<sub>2</sub>, dok je srebro bilo toksičnije u odnosu na cerij za obje vrste. Nadalje, pokazano je da je alga *D. salina* manje osjetljiva od *C. autotrophica* bez obzira na odsutnost stanične stijenke (Sendra i sur., 2017). Nadalje, na 14 vrsta cilijata ispitivana je toksičnost i sudbina NP CeO<sub>2</sub>. Dokazano je da s povećanjem koncentracije raste i toksičnost te da je sirovi materijal manje toksičan od NP (utjecaj omjera površine i volumena) (Zhang i sur.,

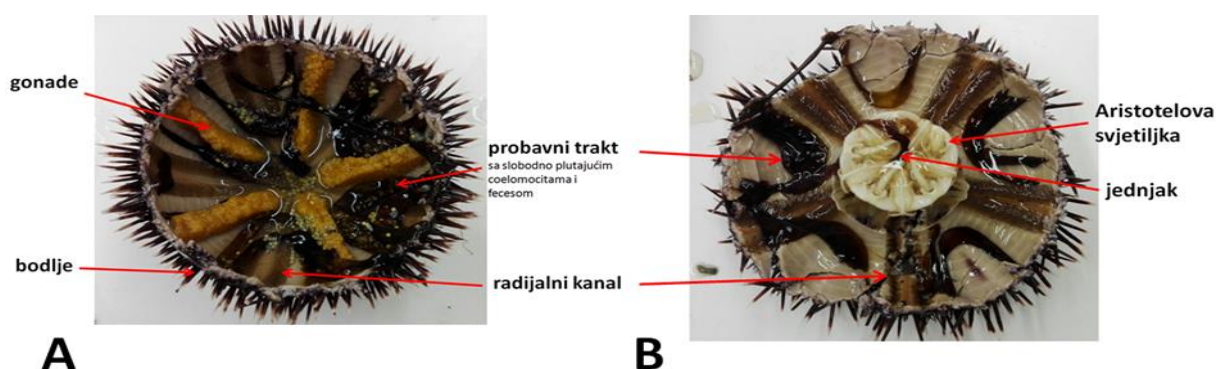
2016). Ispitujući toksičnost i biodostupnost NP CeO<sub>2</sub>, Van Hoecke i sur. (2011) zaključili su da ona u velikoj mjeri ovisi o sredini u kojoj se čestice nalaze te da je prilikom ispitivanja njihovog utjecaja na okoliš bitna prisutnost NOM-a koja najvjerojatnije smanjuje njihovu toksičnost. Nakon prisilnog hranjenja s NP CeO<sub>2</sub> ispitivanja na ježincu *P. lividus* dokazala su prisutnost istih unutar imunoloških stanica (coelomocita). Uočena je smanjena aktivnost kolinesteraze, smanjena razina proteina HSC70 i razina proteina GRP78 te su zabilježena morfološka oštećenja lizosoma. Prisutnost NP 5 dana nakon tretmana vjerojatno ukazuje na nemogućnost organizma da ih ukloni uzrokujući bioakumulaciju i toksičnost (Falugi i sur., 2012). Ispitivanja na bijelom ježincu *Lytechinus pictus* nisu pokazala utjecaj na njegov embrionalni razvoj do koncentracije NP CeO<sub>2</sub> i TiO<sub>2</sub> od 10 mg/L, za razliku od NP ZnO koji je pokazao vrlo visoku toksičnost. Istraživanje je pokazalo da NP TiO<sub>2</sub> i CeO<sub>2</sub> agregiraju i brzo sedimentiraju (unutar 30 - 60 min) u prirodnim vodama, uključujući morsku vodu, te da u njima nisu topive (Fairbairn i sur., 2011). Studija na ribi zebrici pokazala je nisku toksičnost NP CeO<sub>2</sub> na njezin embrionalni razvoj. Nanočestice CeO<sub>2</sub> bile su bez omotača te je njihova niska toksičnost djelomično pripisana aglomeraciji NP koja mijenja omjer površine i volumena i time smanjuje nanočestična svojstva (Wehmas i sur., 2015).

### **1.3. Ježinci kao modelni organizmi u toksikološkim istraživanjima**

Ježinci su morski beskralješnjaci (Avertebrata). To su višestanični organizmi svrstani u koljeno bodljikaša (Echinodermata) i razred Echinoidea. U koljeno Echinodermata još spadaju: zvjezdače (Asteroidea), zmijače (Ophiuroidea), trpovi (Holothuroidea), stapčari (Crinoidea) i morske tratinčice (Concentricycloidea). Razred Echinoidea može se podijeliti prema vanjskom izgledu na dva podrazreda: pravilnjake (Regularia) i nepravilnjake (Irregularia). Ta dva razreda podijeljena su obzirom na poziciju oralnog otvora u odnosu na središte čahure tj. središte osi tijela, simetriju tijela, karakteristike bodlji te oblik tijela. Ježinci podrazreda Regularia imaju pentaradijalnu simetriju čahure. Os tijela im se proteže kroz središte tijela te povezuje oralnu (donju) i aboralnu (gornju) stranu tijela. Imaju okruglastu ili ovalnu čahuru te čvrste i duge bodlje kojima se kreću po morskom dnu čineći dio epifaune. Ježinci podrazreda Irregularia imaju bilateralnu simetriju tijela te im je čahura najčešće spljoštenog i jajastog oblika. Usta im se ne nalaze u središtu osi tijela, već su im pomaknuta prema naprijed ili natrag.

Zbog načina na koji žive (djelomično zakopani u sediment) čine infaunu, pa su im s toga potrebne mekane i četinaste bodlje (Stanković, 2009). Čahura ježinaca građena je od pločica kožnog skeleta koje su pravilno poredane i povezane dok im površinu čini jednoslojni epiderm te su tako koža i skeletni sustav organa međusobno vrlo blisko povezani. S donje strane tijela koja je okrenuta prema podlozi, nalaze se usta dok se s aboralne strane nalaze spolni i crijevni otvor. Na oralnoj strani nalazi se pet krupnih i trokutastih zubi koji su dio žvačnog aparata tj. Aristotelove svjetiljke sastavljene od mnogo vapnenastih dijelova. Aristotelovu svjetiljku čini 25 skeletnih dijelova, a dio je probavnog sustava koji počinje usnim otvorom, nastavlja se na usnu šupljinu, ždrijelo, jednjak i želudac. Želudac se kružno pruža kroz tjelesnu šupljinu te se zaokreće za 180° i prelazi u crijevo. Crijevo završava analnim otvorom kroz koji se izbacuju neprobavljeni ostaci hrane. Blizu okruglog usnog membranoznog polja tj. peristome, nalazi se pet pari usnih nožica koje su smještene u radijima. Te nožice čine dio ambulakralnog sustava i služe za izbor hrane i njegovo usmjeravanje prema ustima. Na njegovom rubu smještene su škrge. Otopljeni kisik iz morske vode difuzijom kroz škrge dopijeva u celomsku tekućinu koja ima respiratornu funkciju. Škrge na svojoj površini imaju trepetljivaki peritonij te uz pomoć mišića vezanih uz Aristotelovu svjetiljku, celomska tekućina ulazi i izlazi iz škrge. Ježinci nemaju specijalizirane organe za izlučivanje pa površina škrge, crijeva i cijelog tijela služe za izlučivanje čineći tako ekskrecijski sustav (Habdija i sur., 2011). Ježinci posjeduju bodlje koje služe za obranu i kretanje. Sastavljene su od tri dijela: baze, kratkog vrata i dugog štapa bodlje (Flugel, 2004). Pričvršćene su kružnim zglobovima za kožni skelet tj. ektodermalni epiderm u kojem se nalaze mišići. Na površini čahure se nalaze udubljenja. Svako udubljenje odgovara zglobu bodlje. U ektodermalnom epidermu se također nalaze osjetilne i žljezdane stanice. Za obranu ježincima služe i štipaljke tj. pedicelarije smještene na peristomu. U njima neke vrste ježinaca mogu posjedovati otrovne žlijezde. Primarna funkcija pedicelarija je čišćenje bodlji i površine tijela ježinca od nečistoća koje se na njih talože. Osim toga služe i za hvatanje plijena, sakupljanje hrane, kamuflažu (držanje kamenčića i algi) i obranu (Harrison, 1994). Kretanje također omogućuju i ambulakralne (prionjive) nožice. To su tanke i zatvorene cjevčice duže od bodlji koje su povezane s ambulakralnim ili vodožilnim sustavom. Smještene su u 10 meridionalnih redova, odmah ispod kože te se pružaju od peristomalne membrane do periprokta (Yokota i sur., 2002) tj. membranoznog područja s pet

međuzračnih pločica na kojima se nalazi spolni otvor. S unutarnjim dijelom čahure ambulakralne nožice povezane su putem ampula. Pomoću njih cirkulira voda i u organizam se unosi kisik, a uklanja ugljični dioksid. Primarna funkcija ambulakralnog sustava je pokretanje, a ostale su: osjetilna, dišna, ekskrecijska i obrambena (ako je povezan s otrovnim žlijezdama). Ambulakralni sustav građen je od kanala, cjevčica i ampula. Kada su kanali, cjevčice i ampule pod pritiskom tj. ispunjene morskom vodom, produže se, potom se kontrahiraju i povlače ostatak tijela što omogućava kretanje. Smanjenjem pritiska morska voda ulazi u ambulakralni sustav i na taj način se uspostavlja ravnoteža. Ambulakralni sustav „završava“ na oralnoj strani. U ambulakralnom području smještena su jajolika ili okrugla tjelešca koje služe kao ravnotežno osjetilo. Nazivaju se kijačice ili sferidiji. U sebi imaju statociste koje sadrže osjetne stanice putem kojih su povezane sa živčanim sustavom. Unutar žvakala se nalazi živčani prsten koji okružuje ždrijelo te iz njega izlaze živci koji su radijalno raspoređeni i pružaju se ispod vodožilnog sustava i krvne žile. Krvožilni sustav ježinaca je sustav otvorenog tipa kod kojeg krv cirkulira kroz krvne žile i izlazi iz njih u tjelesnu šupljinu. Uloga krvožilnog sustava je da se hranjive tvari transportiraju unutar organizma. Ježinci imaju razdvojene spolove i vanjsku oplodnju. Spolni sustav ježinaca smješten je na aboralnoj strani. U interradijima nalazi se 5 gonada. Gonade su sa spolnim otvorima povezane kratkim godonuktima na pet spolnih pločica. Gonade vrećastog ili grozdastog oblika zauzimaju najveći dio unutrašnjosti tijela (Slika 5), čak i do 80% (Habdića i sur., 2011).



**Slika 5.** Presijek ježinca *S. granularis* s prikazom unutarnjih organa (Burić, 2018).

U ekološkim, toksikološkim, ekotoksikološkim, molekularno-biološkim i biokemijskim istraživanjima ježinci se često koriste jer predstavljaju vrlo pogodan modelni, etički

prihvatljiv organizam. Najbliži su srodnici kralješnjaka, a time i ljudi. Vrlo im je sličan embrionalni razvoj, pogotovo rani embrionalni stadiji. Pogodni su za istraživanja jer izlučuju velike količine gameta u okoliš. Ježinci imaju vanjsku oplodnju pa se postupak oplodnje može jednostavno obaviti u laboratorijskim uvjetima. Uz kontrolirane uvjete (npr. konstantna temperatura) lako se može pratiti njihov embrionalni razvoj. Ježinci prolaze kroz različite razvojne stadije. U prvim minutama, netom nakon oplodnje, dolazi do stvaranja fertilizacijske membrane, nakon čega dolazi do procesa zvanog fuzija jezgre (30 do 45 minuta nakon oplodnje). Brzom mitotičkom diobom iz jednostanične zigote nastaje višestanični embrij. Nakon oplodnje dolazi do jednake diobe koja obuhvaća prve tri diobe. Naziva se jednakom diobom, jer je veličina stanica unutar zigote jednaka (Burić, 2018). Sam proces diobe naziva se brazdanje zigote, a nastale stanice nazivaju se blastomere. Prva dioba nastupa 60 do 90 minuta nakon oplodnje (ovisno o vrsti ježinca). Od jedne stanice nastaju dvije identične stanice. Druga dioba daje četiri, a treća osam stanica. Između blastomera, kada zigota ima osam stanica, nastaje malena šupljina koja se nastavkom diobe širi i nakon nekog vremena tvori blastocel, unutar kojeg se nalazi tekućina koja u većem dijelu sadrži morsku vodu. Otprilike oko 6 h nakon oplodnje dolazi do četvrte diobe koja se odvija sve do nastanka šupljine unutar embrija na taj način nastaje 16 stanica, a to je ujedno i početak morule (Burić, 2018). Daljnjom diobom nastaju 32 stanice, a potom 64 stanice. Stadij u kojem je embrij građen od oko 64 stanice naziva se morula. Morula je okrugla nakupina gusto zbijenih stanica kod koje se ne mogu razabrati različiti slojevi. Nastavkom diobe stanice postaju sve manje. Sedmom diobom nastaje blastula koja sadrži približno 128 stanica i sadrži tekući blastocel koji je karakterističan za stadij blastule. Nalikuje na šuplju kuglu čije su blastomere jednakih dimenzija. Nakon toga dolazi do smanjenja stope stanične diobe. Nakon 10 do 12 h od oplodnje blastula sadrži otprilike 600 stanica te otpušta enzime „izlijeganja“. Oni otapaju fertilizacijsku membranu koja zatim nestaje i nastupa proces gastrulacije. Gastrula nastaje procesom gastrulacije iz blastule 20 do 24 sata nakon oplodnje i sadrži oko 1000 stanica. U tom stadiju dolazi do pojave tri zametna sloja tj. zametnih listića: ektoderma, mezoderma i endoderma. Na početku gastrula je diploblastična tj. ima dva zametna listića (ektoderm i endoderm, a mezoderm čine mikromere - stanice primarnog skeleta). Nakon faze gastrule embrij poprima oblik piramide, pa se taj stadij naziva stadij prizme. Dolazi do promjene oblika embrija i početka diferencijacije larve. U

stadiju prizme u potpunosti je formirano crijevo i usta te je moguće samostalno konzumiranje hrane (plankton). Nakon stadija prizme razvija se ličinka dipleurula koja ima bilateralnu simetriju i na nekim dijelovima površine tijela trepetljike koje joj služe za plivanje. S vremenom nastaje ličinka pluteus koja je puno pokretljivija (samoplivajuća) u odnosu na dipleurulu zbog puno dužih nastavaka prekrivenih s trepetljikama. Skeletne pločice odraslog ježinca počinju nastajati pred kraj ličinačkog stadija i zbog toga počinje tonuti prema dnu. Dolazi do metamorfoze iz bilateralne u pentaradijalnu simetriju i time pluteus postaje mladi bentoski ježinac.

Ježinci su vrlo rasprostranjena skupina organizama, a u Jadranskom moru pronađeno je ukupno 20 vrsta (Burić, 2018). Najkarakterističnije i najdostupnije vrste ježinaca u Jadranu su: *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis*.

### 1.3.1. Ježinac *Arbacia lixula*

Crnog ježinca (*Arbacia lixula*) opisao je Linné 1758. godine (Slika 6). Karakteriziraju ga brojne duge crne bodlje. Za razliku od ježinca *P. lividus* nema pedicelarije na leđnoj strani te se zato rjeđe kamuflira kamenčićima, školjkama ili algama (Burić, 2018). Čahura mu je ružičaste ili narančaste boje promjera oko 6 cm (Zaštita mora - *A. lixula*, 2018). Obitava na hridinastom dnu na dubini do nekoliko metara.



Slika 6. Ježinac *Arbacia lixula* (Zaštita mora – *A. lixula*, 2018).

### 1.3.2. Ježinac *Paracentrotus lividus*

Ljubičasti ježinac (*Paracentrotus lividus*) prikazan je na Slici 7. Prvi ga je opisao Lamarck 1816. godine. Naziva se još hridinski ježinac ili pak ježinac kamenjar. Nastanjuje stjenovitu i kamenitu podlogu u litoralu do dubine od 32 m, ali najčešće



obitava na dubinama od 1 - 6 m. Čahura mu je najčešće tamnoljubičaste boje. Bodlje su rijetke i mogu biti tamnoljubičaste, crno-smeđe ili crno-zelene boje. Čahura mu je ventralno poravnata, ponekad i dorzalno, a kod odraslog ježinca njezin promjer iznosi oko 7 cm. Kako bi se kamuflirao, koristi ostatke školjkaša, puževa ili algi (Zaštita mora - *P. lividus*, 2018).



**Slika 7.** Ježinac *Paracentrotus lividus* (Zaštita mora - *P. lividus*, 2018).

#### **1.3.3. Ježinac *Sphaerechinus granularis***

Lamarck je 1816.g. opisao pjegavog ježinca (*Sphaerechinus granularis*) prikazanog na Slici 8. Ježinac *S. granularis* naziva se pjegavim ježincem zbog kratkih, jakih i ljubičastih bolji koje završavaju malim, bijelim poljem (Burić, 2018). Bodlje mogu biti i crvene, bijele ili smeđe boje. Čahura ovog ježinca je tamnoljubičaste boje promjera do 13 cm (Zaštita mora - *S. granularis*, 2018). Obitava na dubinama od 5 do 120 m na koraligenskom tvrdom ili pješčanom dnu (Turk, 2011).



**Slika 8.** Ježinac *Sphaerechinus granularis* (Zaštita mora – *S. granularis*, 2018).

#### **1.3.4. Test embrionalnog razvoja ježinca**

Test embrionalnog razvoja ježinca (engl. *Sea Urchin Embryo Development Test*, SUEDT) je jednostavan, jeftin i vrlo koristan standardni test koji se koristi za ispitivanje toksičnosti zagađivala na organizme (Cesar i sur., 2009; Beiras i sur., 2003). Prednost



ovog testa u odnosu na druge testove je kratak vremenski period izvođenja u laboratorijskim uvjetima (kod ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* 48, a kod ježinca *S. granularis* 72 sata). Učinak zagađivala na embrionalni razvoj ježinaca može se pratiti na morfološkoj razini, što test čini ekonomski isplativim. Za njegovo izvođenje nije potrebna kompleksna oprema (Matranga i Corsi, 2012).

Ježinci se koriste kao modelni organizmi jer su im metabolički i fiziološki putevi slični sisavcima. U ranim embrionalnim fazama imaju genomsku homologiju s visokim kralješnjacima (uključujući čovjeka). Od trenutka oplodnje razvojni stadiji su im jednaki sve do stadija morule (Falugi i sur., 2012). Nadalje, pozitivna strana testa embrionalnog razvoja ježinaca je i u tome što ježinci imaju vanjsku oplodnju, stoga ih je vrlo jednostavno oploditi u laboratorijskim uvjetima. Izlučuju veliki broj jajnih stanica pa se može dobiti i veliki broj embrija što u konačnici rezultira velikim brojem larvi koje se koriste pri provođenju eksperimenta, a veliki broj larvi u konačnici u jednom uzorku umanjuje standardnu pogrešku eksperimenta.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je primjenom testa embrionalnog razvoja ježinca ispitati potencijalnu toksičnost nanočestica cerijevog (IV) oksida (NP CeO<sub>2</sub>) na embrionalni razvoj triju vrsta Mediteranskih ježinaca: *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus*, i *Sphaerechinus granularis*. U tom cilju ispitivana je sposobnost oplodnje spermija ježinaca prethodno tretiranih različitim koncentracijama nanočestica cerija, te se pratio razvoj oplođenih jajnih stanica do morfološkog stadija larve. Također se ispitalo kako na embrionalni razvoj ježinaca utječe izlaganja zigote različitim koncentracijama NP CeO<sub>2</sub> netom nakon oplodnje.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kemikalije

U ovom završnom radu korištene su sljedeće kemikalije: kalijev klorid (KCl), kromov (II) sulfat ( $\text{CrSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) (dobavljač Kemika), ultračista voda (18M $\Omega$ ), filtrirana morska voda te nanočestice cerijeva (IV) oksida ( $\text{CeO}_2$ ). KCl je korišten za poticanje lučenja gameta iz gonada ježinaca. Kromov (II) sulfat upotrijebljen je za imobilizaciju larvi u cilju njihovog lakšeg brojanja. Za dobivanje filtrirane morske vode koristila se prirodna morska voda Sjevernog Jadrana (saliniteta 38,1 i pH 8,1). Voda je filtrirana kroz Whatmanove membranske filtere veličine pora od 0.2  $\mu\text{m}$ . Nanočestice cerijevog (IV) oksida dobivene su od „Zajedničkog istraživačkog centra Europske komisije“ (engl. *European Commission Joint Research Centre*, JRC) iz Ispre (Italija). Prema specifikaciji proizvođača nanomaterijal, tvorničkog naziva „NM 212/3413“, sadržavao je NP  $\text{CeO}_2$  istaložene i bez omotača. Srednja veličina čestica (engl. *mean particle size*) bila je oko 28 nm. Osnovna veličina čestica (engl. *primary particle size*) iznosila je približno 33 nm, dok je njihova specifična površina (engl. *specific surface area*) iznosila oko 28 m<sup>2</sup>/g.

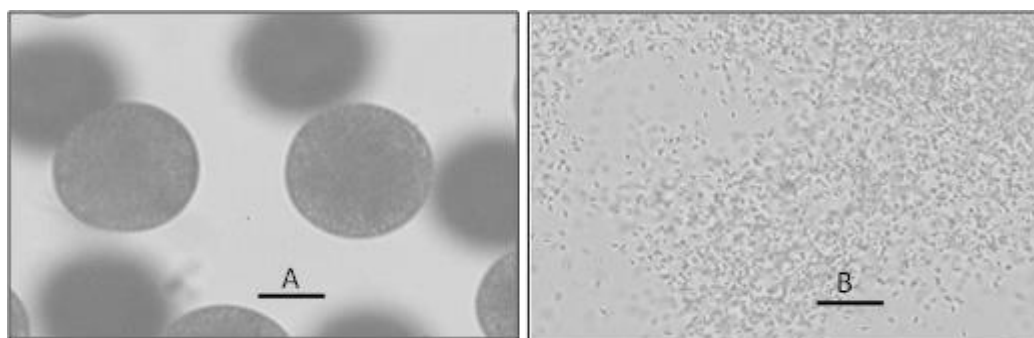
#### 3.2. Određivanje učinka nanočestica cerijeva (IV) oksida ( $\text{CeO}_2$ ) na embrionalni razvoj tri vrste ježinaca: *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis*

##### 3.2.1. Sakupljanje ježinaca

Za potrebe eksperimenta ježinci vrste *A. lixula* i *P. lividus* sakupljeni su pomoću mrežice s obale u listopadu 2016. godine u uvali Valkane (Pula, RH) (GPS koordinate: 44°51'20"N, 13°49'33"E). Budući da vrsta *S. granularis* obitava na dubinama većim od 20 m za njihovo prikupljanje angažirani su ronionci Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković. Ježinci *S. granularis* sakupljeni su s obalnog područja okolice grada Rovinja (RH) (GPS koordinate: 45°04'47"N, 13°38'24"E). Nakon prikupljanja ježinci su stavljeni u prijenosnu hladnjaču s morskom vodom i kroz sat vremena dopremljeni na Institut gdje su prebačeni u vanjski akvarij sa stalnim protokom morske vode te su unutar tjedan dana korišteni za eksperiment.

### 3.2.2. Izdvajanje gameta ježinaca i oplodnja

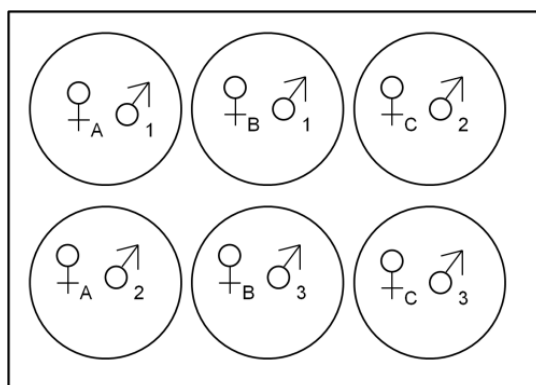
U eksperimentu je korišteno 6 ježinaca (3 ženke i 3 mužjaka) svake vrste ježinca (*A. lixula*, *P. lividus* i *S. granularis*). Kako bi se potaknulo lučenje gameta, uokolo peristomialne membrane, injektirano je 0.7 - 1.5 mL 0.5 M kalijeva klorida (3,73 g KCl otopljeno je u 100 mL destilirane vode). Ježinci su zatim protreseni kako bi se KCl ravnomjerno rasporedio i što brže dospio do gonada. Neposredno nakon injektiranja KCl-a ježinci su počeli izlučivati gamete (Slika 9). Na osnovu izgleda suspenzije gameta određen je spol jedinki. Mužjaci su ispuštali spermije mliječno bijele boje na aboralnoj strani. Spermiji ježinaca sakupljeni su pipetom i prebačeni u Eppendorf tubice od 1.5 mL koje su zatim smještene u posudu s ledom kako bi im se produžio životni vijek. Spermiji nisu smjeli doći u doticaj s morskom vodom sve do trenutka same oplodnje jer se u kontaktu s morskom vodom aktiviraju i ostaju pokretni svega 10-ak minuta do pola sata. Za razliku od mužjaka, ženke ježinaca ispuštale su narančastu ili tamno crvenu suspenziju jajnih stanica. Narančaste su boje jajne stanice ježinaca *P. lividus* i *S. granularis* dok su jajne stanice vrste *A. lixula* tamno crvene (bordo) boje. U trenutku kada je utvrđeno da se radi o ženskoj jedinki ježinca ona je aboralnom stranom uronjena u čašu s filtriranom morskom vodom te su se jajne stanice taložile na dnu čaše. Nakon toga jajne stanice sakupljene su pipetom i prenesene u falkonicu od 15 mL te je takva suspenzija služila kao ishodišna suspenzija za oplodnju.



**Slika 9.** Gamete ježinca *A. lixula*: (A) jajne stanice i (B) spermiji (mjerilo 20  $\mu$ m).

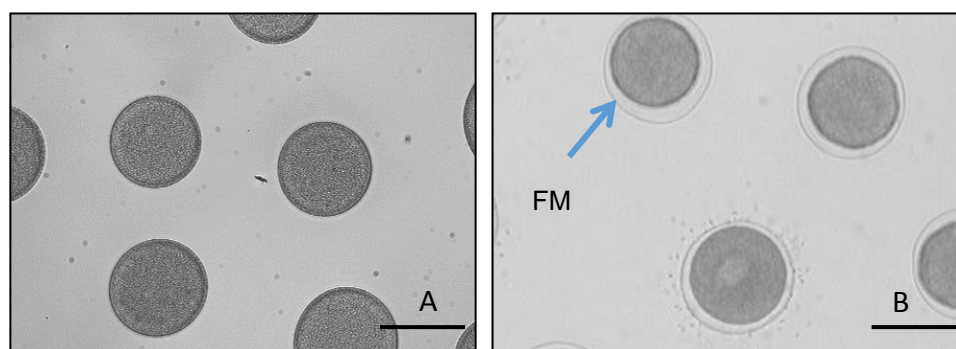
Proces oplodnje odvijao se u 5 ploča sa 6 jažica. U svaku jažicu stavljeno je redom: 5 mL filtrirane morske vode, potom je dodano 50  $\mu$ L razrijeđene suspenzije jajnih stanica. Razrijeđena suspenzija jajnih stanica pripremljena je tako što je koncentrirana ishodišna suspenzija izoliranih jajnih stanica razrijeđena 8 puta. Jajne stanice prve

ženke (od 3 ženke iste vrste) nacijepljene su u dvije paralelne jažice. Postupak je ponovljen i za jajne stanice druge i treće ženke (u susjedne paralelne jažice, prema Shemi na Slici 10). Oplodnja započinje dodavanjem 1 mL sperme u jažice s jajnim stanicama. Sperma se dodaje u jažicu laganim kružnim pokretima kako bi se pravilno rasporedila, tj. kako bi što više jajnih stanica bilo oplođeno. Sperma svakog ježinca nacijepljena je u jažice isto tako prema Shemi na Slici 10.



**Slika 10.** Shema oplodnje ježinaca u jažicama.

U jažice je zatim dodano još 5 mL filtrirane morske vode kako bi se suspenzija bolje izmiješala i kako bi se povećao volumen vrlo koncentrirane suspenzije zigota, odnosno kako bi larve imale dovoljan prostor za kretanje u stadiju pluteusa (48/72 h nakon oplodnje.) Nakon oplodnje embriji su čuvani na temperaturi od 20 °C.



**Slika 11.** Neoplođena (A) i oplođena jajna stanica ježinca *P. lividus* (B) (FM – fertilizacijska membrana; mjerilo 50 µm).

Na Slici 11 vidi se razlika između neoplođene i oplođene jajne stanice s formiranom fertilizacijskom membranom (FM).

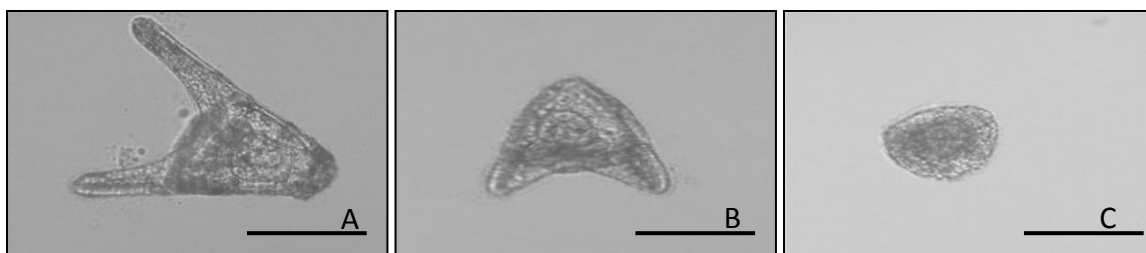
### **3.2.3. Tretiranje embrija ježinaca *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis* s nanočesticama cerija**

#### ***Priprema suspenzije nanočestica***

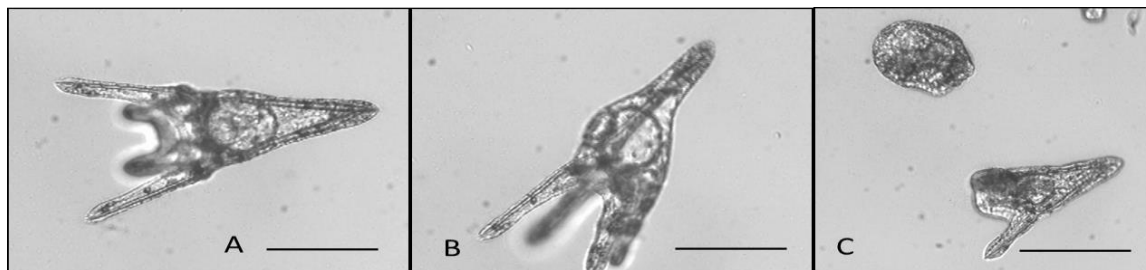
Za pripremu suspenzija nanočestica korištene su nanočestice cerijeva (IV) oksida prethodno opisane u poglavlju 3.1. Dvije izvorne suspenzije nanočestica koncentracije 20 µg/mL (početna suspenzija 1) i 200 µg/mL (početna suspenzija 2) NP cerijeva (IV) oksida pripremljene su korištenjem ultračiste vode. NP su raspršene pri sobnoj temperaturi ultrazvučnim homogeniziranjem u trajanju od 30 minuta pri snazi ultrazvuka od 30 W i frekvenciji od 35 kHz (Sonorex Digitec, Bandelin). Izvorna suspenzija od 20 µg/mL korištena je za tretman jažica konačnih (ispitivanih) koncentracija od 10, 100 i 1000 µg/L. Suspenzija od 200 µg/mL korištena je za tretman jažica od 10 000 µg/L NP cerija. Razrjeđenja za tretman jažica pripremljena su na sljedeći način: za dobivanje 10 000 µg/L, ishodna suspenzija od 200 µg/mL NP je razrijeđena 20 puta: 0.5 mL u 10 mL FMV (filtrirane morske vode). Za dobivanje 1000 µg/L, početna suspenzija od 20 µg/mL NP CeO<sub>2</sub> je razrijeđena 20 puta: 0.5 mL u 10 mL FMV. Za dobivanje 100 µg/L, ishodna suspenzija od 20 µg/mL NP CeO<sub>2</sub> je razrijeđena 200 puta: 0.05 mL u 10 mL FMV. Za dobivanje 10 µg/L, ishodna suspenzija od 20 µg/mL NP CeO<sub>2</sub> razrijeđena je 2000 puta i ona predstavlja prvo razrjeđenje ili ishodnu suspenziju br.3: 250 µL 20 µg/mL NP CeO<sub>2</sub>: 0.05 mL u 10 mL FMV.

#### ***Tretiranje embrija ježinaca s različitim koncentracijama NP CeO<sub>2</sub>***

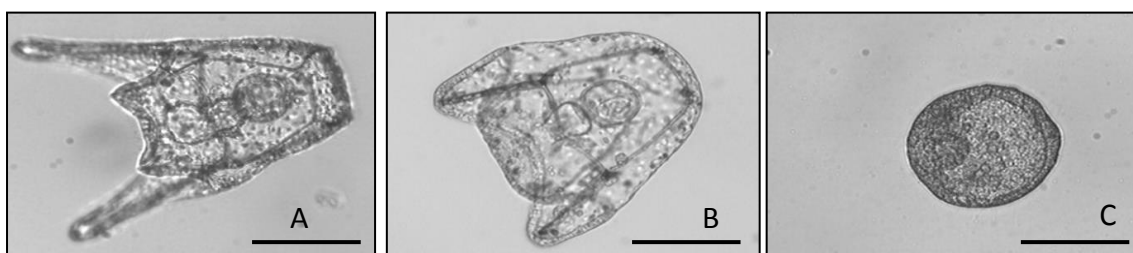
Embriji ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* 30 min. nakon oplodnje tretirani su suspenzijama NP različitih koncentracija. Uspješnost dosezanja larvi u stadiju pluteusa brojana je nakon 48 sati. Embriji ježinaca *S. granularis* 45 min. nakon oplodnje tretirani su suspenzijama NP različitih koncentracija. Uspješnost dosezanja stadija larvi brojana je nakon 72 sata. Uspješnost dosezanja larvi u stadiju pluteusa brojana je u svakoj jažici na 100 embrija. Za lakše brojanje embriji su imobilizirani kromovim (II) sulfatom (CrSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O). Za brojanje je korišten inverzni mikroskop. Rezultati promatranja razvrstani su u tri kategorije: normalno razvijena larva (NL), zaostala larva (ZL) i nerazvijeni embrij (NE), kako je prikazano na Slikama 12, 13 i 14 za sve tri vrste promatranih ježinaca.



**Slika 12.** Normalna larva (A), zaostala larva (B) i nerazvijeni embriji (C) ježinca *A. lixula* (mjerilo 100  $\mu\text{m}$ ).


















**Slika 13.** Normalna larva (A i B), zaostala larva i nerazvijeni embriji (C) ježinca *P. lividus* (mjerilo 100  $\mu\text{m}$ ).



**Slika 14.** Normalna larva (A), zaostala larva (B) i nerazvijeni embriji u ranom stadiju gastrulacije (C) ježinca *S. granularis* (mjerilo 100  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2.4. Tretiranje sperme ježinaca s nanočesticama cerija te kvaliteta potomstva

Korištene su tri čašice po vrsti ježinca (Slika 15) za svaku pojedinu koncentraciju NP  $\text{CeO}_2$  te je svaka čašica bila predodređena za spermu jednog mužjaka (od 3 muške jedinke). To je napravljeno kako bi se eliminirala mogućnost da suspenzija u kojoj su pripremljene nanočestice utječe na dobivene rezultate tj. kako bi bilo sigurno da su rezultati isključivo posljedica učinka NP  $\text{CeO}_2$ . Nakon toga, u svaku je čašicu dodano 10 mL filtrirane morske vode i u konačnici 20  $\mu\text{L}$  suho izolirane suspenzije sperme.

c (NP CeO <sub>2</sub> ) u µg/L	sperma ježinca 1	sperma ježinca 2	sperma ježinca 3
0			
10			
100			
1000			
10 000			

**Slika 15.** Shema predtretmana sperme.

Opisani postupak je primijenjen kod sve 3 vrste ježinaca. Za razliku od sperme ježinaca *A. lixula* i *P. lividus*, čija je sperma ostavljena u interakciji s različitim koncentracijama nanočestica sat vremena, sperma ježinca *S. granularis* ostavljena je u interakciji s nanočesticama samo 10 min., budući je njihova sperma puno osjetljivija od sperme ostala dva ježinca. Ukoliko bi sperma *S. granularis* ostala u kontaktu s NP predugo došlo bi do njezine imobilizacije (bez obzira na to je li sperma prethodno tretirana s NP ili ne) te samim time ne bi došlo do oplodnje jajnih stanica. Postupak oplodnje u jažicama opisan je u poglavlju 3.2.2. (spermiji prethodno tretirani različitim koncentracijama NP CeO<sub>2</sub>). Jedan sat nakon oplodnje s tretiranim spermijima brojana je uspješnost oplodnje za vrste ježinca *A. lixula* i *P. lividus*. Uspješnost dosezanja faze larvi brojana je nakon 48 sati. Dva sata nakon oplodnje s tretiranim spermijima brojana je uspješnost oplodnje za vrstu *S. granularis*. Uspješnost dosezanja faze larvi kod ove vrste brojana je nakon 72 sata.

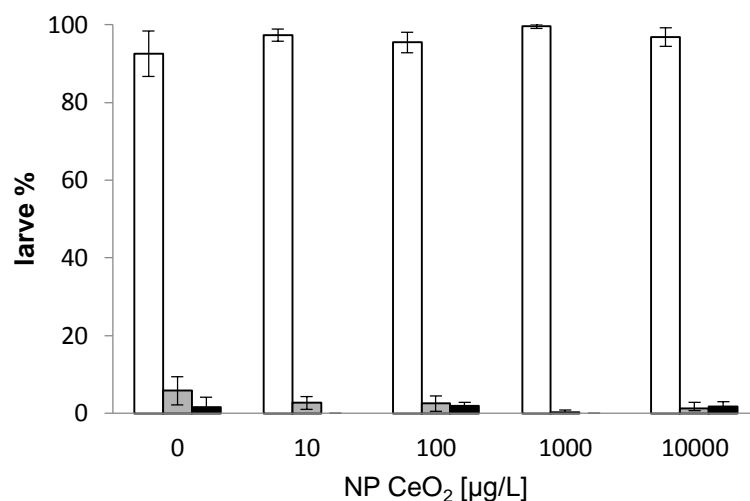


## 4. REZULTATI

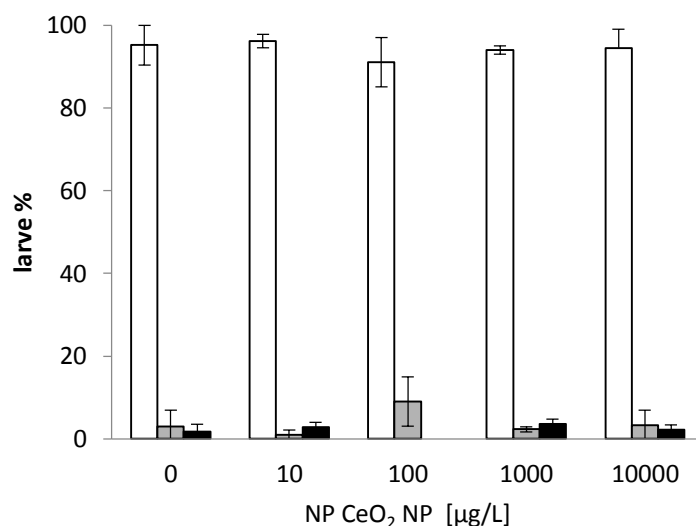
### 4.1. Određivanje uspješnosti dosezanja stadija larvi ježinaca *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis* nakon tretiranja embrija s nanočesticama cerija

Prikazana je uspješnost embrionalnog razvoja ježinca *A. lixula* nakon tretmana s NP cerija na Slici 16. U kontrolnom uzorku postotak normalno razvijenih larvi (NL) iznosio je 92.60%, zaostalih larvi (ZL) bilo je 5.80% te nerazvijenih embrija (NE) 1.60%. Pri koncentraciji od 10 µg/L NP cerija broj NL se povećava u odnosu na kontrolni uzorak i iznosi 97.33% što je 4.73% više od kontrolnog uzorka. Broj (ZL) iznosio je 2.67% dok nerazvijenih embrija nije bilo. Kod koncentracije od 100 µg/L NP cerija postotak NL bio je 95.50% (2.90% više u odnosu na kontrolni uzorak), ZL 2.50% (što je 3.30% manje od kontrolnog uzorka) te 2.00% NE što je 0.40% više od kontrolnog uzorka. Najviši postotak NL zapažen je pri koncentraciji od 1000 µg/L NP cerija te je iznosio 99.67% (7.07% više u odnosu na kontrolni uzorak). Postotak ZL iznosio je 0.33%, dok nerazvijenih embrija nije bilo. Pri koncentraciji NP cerija od 10 000 µg/Li postotak NL bio je 96.83%, zaostalih larvi 1.33% te 1.83% nerazvijenih embrija, što je neznatno više od kontrolnog uzorka 0.23%.

Uspješnost embrionalnog razvoja do stadija pluteusa larve ježinca *P. lividus* nakon tretmana s NP cerija prikazana je na Slici 17. Postotak NL u kontrolnom uzorku bio je 95.17%, postotak ZL 3.00% te nerazvijenih embrija 1.83%. U odnosu na kontrolni uzorak pri koncentraciji od 10 µg/L NP cerija broj NL se neznatno povećao i iznosio je 96.17% što je 1% više od kontrolnog uzorka: broj ZL 1.00% i nerazvijenih embrija je bilo 2.83%. Koncentracija NP cerija od 100 µg/L rezultirala je s 91.00% NL, 9.00% ZL (najviši zamijećeni postotak NL u ove vrste ježinca), a nerazvijenih embrija nije bilo. Normalno razvijenih larvi bilo je 94.00%, 2.33% zaostalih larvi i 3.67% nerazvijenih embrija je bilo pri koncentraciji od 1000 µg/L NP cerija (najviši zamijećeni postotak NE u ove vrste ježinca). Pri koncentraciji od 10 000 µg/L NP cerija bilo je 94.50% NL, 3.33% ZL i 2.17% NE.



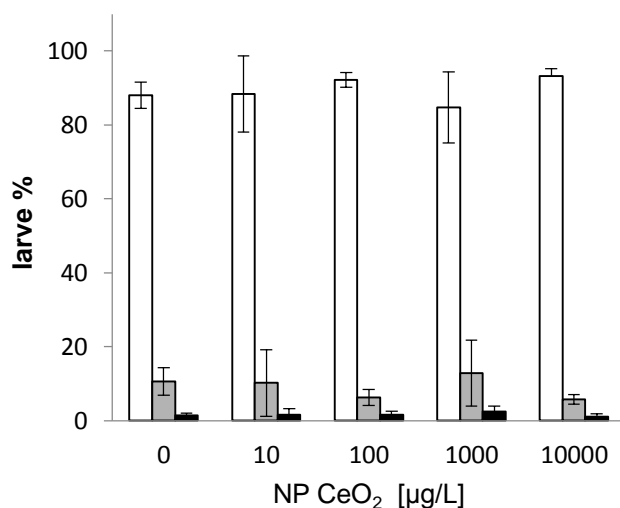
**Slika 16.** Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinca *A. lixula* tretiranih različitim koncentracijama NP CeO<sub>2</sub> 30 min. nakon oplodnje.



**Slika 17.** Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinca *P. lividus* tretiranih različitim koncentracijama NP CeO<sub>2</sub> 30 min. nakon oplodnje.

Slika 18. prikazuje tretman i embrionalni razvoj ježinca *S. granularis* tretiranih 45 minuta nakon oplodnje s NP cerija. U kontrolnom je uzorku izbrojeno 88.00% NL, 10.60% ZL i 1.40% NE. Pri koncentraciji od 10 µg/L NP cerija normalno razvijenih larvi bilo je 88.33%, 10.16% ZL i 1.50% NE, dok je 92.20% NL, 6,20% ZL i 1.60% NE bilo pri koncentraciji od 100 µg/L. Pri koncentraciji od 1000 µg/L NP cerija izbrojan je

najveći broj ZL (12.83%) i nerazvijenih embrija (2.50%), pa samim time i najmanji broj NL (84.66%). Pri porastu koncentracije NP cerija na 10 000 µg/L zamijećen je najviši broj NL (93.25%) u odnosu na sve promatrane koncentracije. Pri ovoj koncentraciji bilo je 5.75% ZL i 1.00% NE.



**Slika**

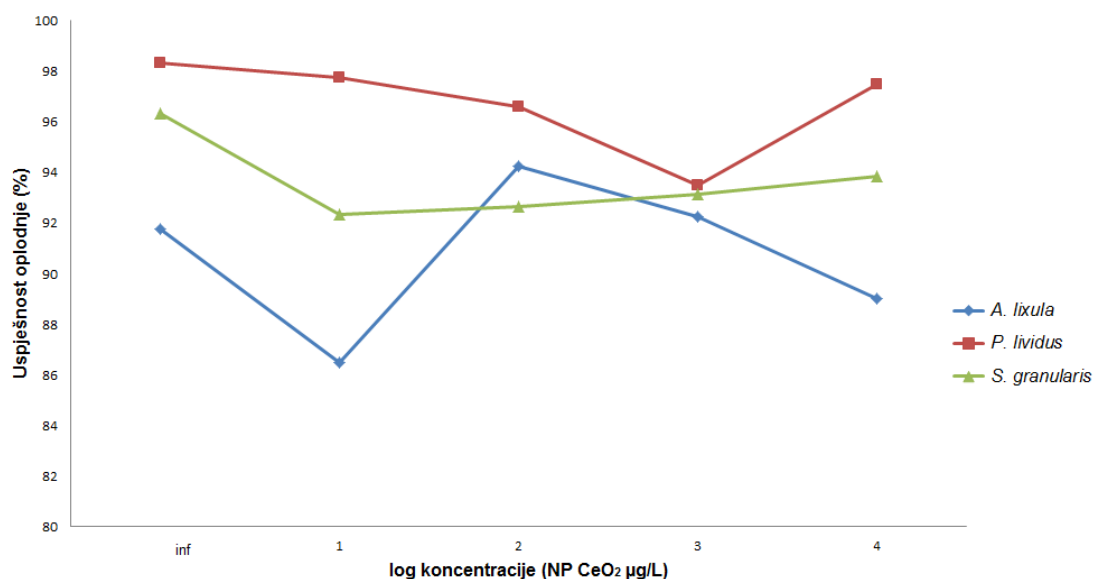
**18.** Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinca *S. granularis* tretiranih različitim koncentracijama NP CeO<sub>2</sub> 45 min. nakon oplodnje.

#### **4.2. Određivanje uspješnosti oplodnje jajnih stanica spermijima prethodno tretiranim s NP CeO<sub>2</sub> i određivanje kvalitete potomstva za ježince: *A. lixula*, *P. lividus* i *S. granularis***

Podaci uspješnosti oplodnje za ježince *A. lixula*, *P. lividus* i *S. granularis* prikazani su u Tablici 2. i na Slici 19.

**Tablica 2.** Uspješnost oplodnje (prikazana u postocima) 1 sat (*A. lixula* i *P. lividus*) i 2 sata (*S. granularis*) nakon oplodnje (predtretman sperme s NP CeO<sub>2</sub>: 1 sat/10 min). DA označava uspješno oplođene jajne stanice, a NE označava neuspjelu oplodnju.

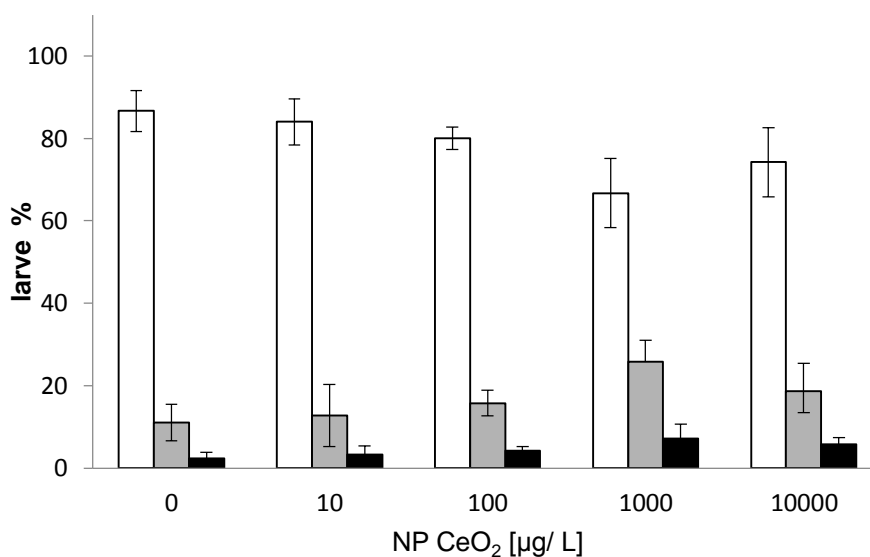
Koncentracija NP CeO <sub>2</sub> [µg/L]	Uspješnost oplodnje [%]					
	<i>A. lixula</i>		<i>P. lividus</i>		<i>S. granularis</i>	
	DA	NE	DA	NE	DA	NE
<b>0</b>	91.75	8.25	98.33	1.66	96.33	3.66
<b>10</b>	86.50	13.50	97.75	2.25	92.33	7.66
<b>100</b>	94.25	5.75	96.60	3.40	92.66	7.33
<b>1000</b>	92.25	7.75	93.50	6.50	93.16	6.83
<b>10 000</b>	89.00	11.00	97.50	2.50	93.83	6.16



**Slika 19.** Uspješnost oplodnje ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* čija je sperma prije oplodnje tretirana 1 h sa NP CeO<sub>2</sub> i ježinca *S. granularis* čija je sperma prije oplodnje tretirana 10 min.

Uspješnost dosezanja stadija pluteusa brojana je 48 sati od oplodnje za vrste *A. lixula* i *P. lividus*, a nakon 72 sata za vrstu *S. granularis*. Slika 20. prikazuje uspješnost dosezanja stadija pluteusa nakon 48 sati za vrstu *A. lixula* čija je sperma tretirana s NP CeO<sub>2</sub> u trajanju od sat vremena. Postotak normalno razvijenih larvi najveći je u kontrolnom uzorku (86.66%), gdje je dobiven najmanji postotak zaostalih larvi (11%) i nerazvijenih embrija (2.33%). Pri koncentraciji od 10 µg/L NP cerija bilo je: 84.00% NL,

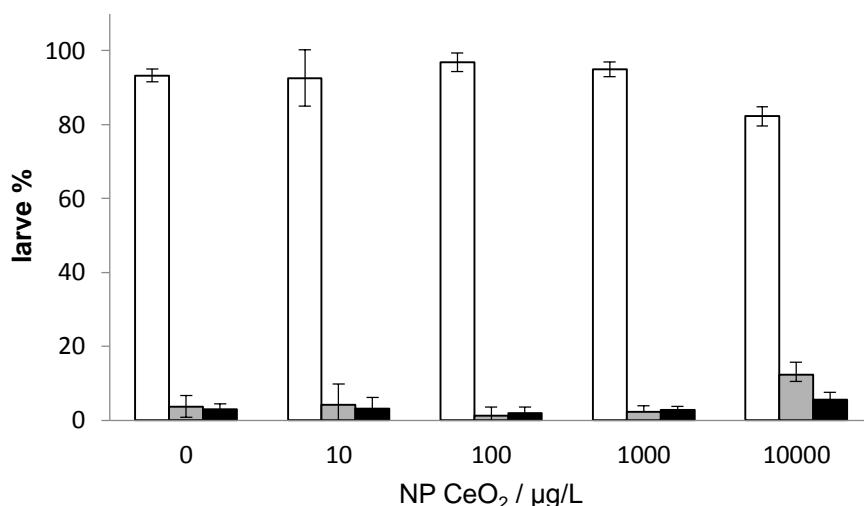
12.75% ZL i 3.25% NE. Pri koncentraciji od 100 µg/L NP cerija bilo je: 80.00% NL, 15.75% ZL i 4.25% NE. Pri koncentraciji od 1000 µg/L javlja se najmanji postotak normalno razvijenih larvi 66.75% (19.91% manje NL u odnosu na kontrolni uzorak) te je najveći postotak ZL i NE: 25.75% i 7.25% (14,75% i 4.92% više u odnosu na kontrolni uzorak). Pri koncentraciji od 10 000 µg/L NP cerija bilo je: 74.25% NL, 18.75% ZL i 5.75% nerazvijenih embrija.



**Slika 20.** Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinca *A. lixula* čija je sperma tretirana 1 sat različitim koncentracijama NP CeO<sub>2</sub> (uspješnost dosezanja stadija pluteusa nakon 48h).

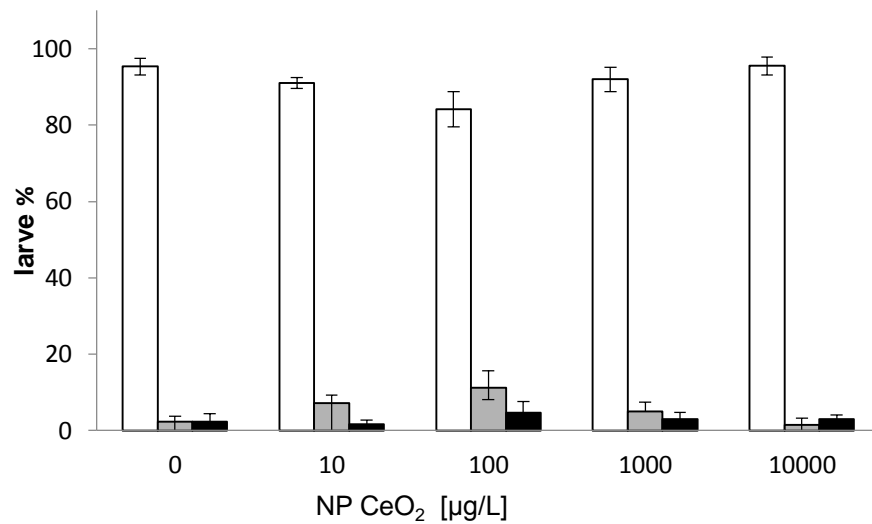
Slika 21. prikazuje uspješnost dosezanja stadija pluteusa nakon 48 sati za vrstu *P. lividus* čija je sperma tretirana s NP CeO<sub>2</sub> u trajanju od sat vremena. Postotak NL u kontrolnom uzorku bio je 93.25%, postotak ZL bio je 3.75% te nerazvijenih embrija 3.00%. Normalno razvijenih larvi bilo je 92.60%, 4.20% ZL i 3.20% NE pri koncentraciji od 10 µg/L NP cerija. Pri koncentraciji od 100 µg/L NP cerija javlja se najveći postotak normalno razvijenih larvi (96.83%), što je 3.58% više od kontrolnog uzorka. Pri ovoj koncentraciji javlja se najmanji postotak ZL i NE: 1.16% i 2.00% (2.59% i 1,00% manje u odnosu na kontrolni uzorak). Bilo je 95.00% NL, 2.25% ZL i 2.75% NE pri koncentraciji od 1000 µg/L NP cerija. Pri koncentraciji od 10 000 µg/L javlja se najmanji postotak normalno razvijenih larvi (82.25% što je 11.00% manje od kontrolnog

uzoraka). Pri toj koncentraciji najveći je postotak ZL i NE: 12.25% i 5.50% (8.50% i 2.50% više u odnosu na kontrolni uzorak).



**Slika 21.** Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinca *P. lividus* čija je sperma tretirana (1h) različitim koncentracijama CeO<sub>2</sub> (uspješnost doseganja stadija pluteusa nakon 48h).

Slika 22. prikazuje uspješnost doseganja stadija pluteusa nakon 72 sata za vrstu *S. granularis* čija je sperma tretirana s NP CeO<sub>2</sub> u trajanju od 10 minuta. Postotak NL u kontrolnom uzorku bio je 95.33%, postotak ZL 2.33% te NE 2.33%. Pri koncentraciji od 10 µg/L NP cerija bilo je 91.00% NL, 7.25% ZL i 1.75% što je najmanji postotak NE (0.58% manje od kontrolnog uzorka). Pri koncentraciji od 100 µg/L javlja se najmanji postotak normalno razvijenih larvi (84.16%) što je 11.17% manje NL u odnosu na kontrolni uzorak, a ujedno i najviši postotak ZL i NE: 11.16% i 4.66% (8.83% i 2.33% više u odnosu na kontrolni uzorak). Pri koncentraciji od 1000 µg/L NP cerija bilo je 92.00% NL, 5.00% ZL i 3.00% NE. Pri koncentraciji od 10 000 µg/L izbrojan je najveći postotak normalno razvijenih larvi od 95.50% NL, što je neznatno više od kontrolnog uzorka (0.17%). Ovdje se javlja najmanji postotak ZL 1.50% (0.83% manje od kontrolnog uzorka) dok je nerazvijenih embrija bilo je 3.00%.



**Slika 22.** Postotak normalnih (bijeli stupci), zaostalih (sivi stupci) larvi te nerazvijenih embrija (crni stupci) ježinca *S.granularis* čija je sperma tretirana 10 minuta različitim koncentracijama NP CeO<sub>2</sub> (uspješnost dosezanja stadija pluteusa nakon 72 h).

## 5. RASPRAVA

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti kako NP prisutne u morskom okolišu ne moraju nužno nanijeti štetu morskim organizmima. Naime, u provedenom ispitivanju zagađivalo su bile sintetizirane NP CeO<sub>2</sub>. Čestice su bile istaložene i bez omotača, a njihove veličina bila je približno 33 nm. Nakon tretiranja embrija ježinaca s NP CeO<sub>2</sub> nastavljen je normalni embrionalni razvoj za sve tri vrste ježinaca *A. lixula*, *P. lividus* i *S. granularis*. Postotak normalno razvijenih larvi kod ježinaca *A. lixula* i *P. lividus* pri svim koncentracijama bio je viši od 90%, dok je za vrstu *S. granularis* bio tek neznatno niži. Nije uočena razlika u usporedbi s kontrolnim uzorkom (preko 90% NL za ježince *A. lixula* i *P. lividus*) i 88% za ježinca *S. granularis*. Povezanost između porasta koncentracije i smanjenja broja normalno razvijenih larvi nije se mogla ustanoviti. Iz dobivenih eksperimentalnih rezultata može se zaključiti da NP CeO<sub>2</sub> ne utječu na embrionalni razvoj ježinaca pri promatranim koncentracijama (10 - 10 000 µg/L). Do sličnih zaključaka došli su Fairbairn i sur. 2011. godine. Naime, oni su isto tako proučavajući utjecaj NP CeO<sub>2</sub> dobili rezultate iz kojih je vidljivo da NP cerija nemaju utjecaj na embrionalni razvoj bijelog ježinca *Lytechinus pictus*. Takvi rezultati dobiveni su i u istraživanju koje su proveli Wehmas i sur. 2015. godine na ribi zebrici. Niska do nikakva toksičnost NP CeO<sub>2</sub> dokazana u spomenutim istraživanjima, kao i rezultatima ovoga rada, može biti uzrokovana time što su NP CeO<sub>2</sub> inertne te time manje toksične (Ispasa i sur., 2009; Van Hoeke i sur., 2009). Tome u prilog idu njihova biokompatibilna i citoprotektivna svojstva (Xia i sur., 2008). Suprotno ovim istraživanjima, Burić i sur. (2015.) dokazali su da izlaganje embrija ježinaca *A. lixula*, *P. lividus* i *S. granularis* NP srebra već pri vrlo niskim koncentracijama ima negativan učinak na njihov daljnji embrionalni razvoj. Naime, najviše ispitivane koncentracije NP Ag od 50 - 100 µg/L uzrokovale su potpuni zastoj embrionalnog razvoja.

U ovom radu, iz rezultata uspješnosti oplodnje jajnih stanica spermijima prethodno tretiranim s NP cerija može se zaključiti kako isti uspješno oplođuju jajne stanice i embrij se dalje razvija do stadija kompletne larve kroz 48/72 h. Može se zaključiti da NP CeO<sub>2</sub> prisutne u morskoj vodi ne utječu na uspješnost oplodnje. Sličan rezultat dobili su Mesarić i sur. 2015. dokazavši da izlaganje sperme ježinca *P. lividus* NP grafenova oksida nije utjecalo na uspješnost oplodnje jajnih stanica. Međutim, rezultati istog istraživanja pokazali su da je uspješnost oplodnje bila znatno reducirana i ovisna



o koncentraciji kada su spermiji bili izloženi NP crnog ugljika različitih koncentracija (0.0001 - 1.0 mg/L). Taj je učinak vjerojatno posljedica veće fizičke interakcije između NP crnog ugljika i sperme u usporedbi s NP grafenova oksida.

Nakon tretmana sperme s različitim koncentracijama NP CeO<sub>2</sub> pratila se uspješnosti dosezanja stadija pluteusa te određivala kvaliteta potomstva. Iz dobivenih rezultata nije se mogla uočiti razlika između kontrolnog uzorka i uzoraka s tretiranim spermijima. Nešto niža uspješnost dosezanja stadija NL javlja se kod *A. lixula* i *P. lividus* pri koncentraciji od 10 000 µg/L. Mogući uzrok tome je vrlo visoka koncentracija NP cerija. Pri koncentraciji od 1000 µg/L kod vrste *A. lixula* javlja se ukupno najmanji broj normalno razvijenih larvi: 66.75 ± 8.34%. Mogući razlog tome je preduga vremenska izloženost kromovom (II) sulfatu prije samog čitanja, odnosno brojanja larvi. Iz svih dobivenih rezultata nije se mogao uočiti utjecaj nanočestica cerija na embrionalni razvoj ježinaca *A. lixula*, *P. lividus* i *S. granularis* pri ispitivanim koncentracijama NP CeO<sub>2</sub>. Dokazano je (Burić, 2018) da NP Ag nemaju negativan učinak na uspješnost oplodnje ježinaca *A. lixula* i *P. lividus*, ali uzrokuju smanjenje kvalitete potomstva za ježinca *A. lixula*. Suprotno rezultatima ovog istraživanja, koja nisu pokazala negativan učinak NP cerija, Lee i sur., (2009) pokazali su na slatkovodnom planktonskom račiću *Daphnia magna* i larvi vodene mušice *Chironomus riparius* da NP CeO<sub>2</sub> mogu izazvati genotoksične učinke na vodene organizme. Na dvije vrste mikroalgi: *Dunaliella salina* i *Chlorella autotrophica* dokazano je da su NP CeO<sub>2</sub> uzrokovale smanjenje aktivnog klorofila i gustoće stanica te utjecale na povećanje složenosti stanica i količinu ROS-a (Sendra i sur., 2017). Booth i sur. (2015) dokazali su da NP CeO<sub>2</sub> stabilizirane poliakrilnom kiselinom uzrokuje povećanu toksičnost (oksidativni stres) kod alge *P. subcapitata*. Moguće je pretpostaviti da je upravo omotač razlog njihove veće toksičnosti u usporedbi s rezultatima ovog rada gdje ispitivane NP cerija nisu imale nikakav omotač na sebi. Za razliku od rezultata ovog istraživanja, Zhang i sur. (2016) pokazali su da je kod 14 vrsta cilijata s povećanjem koncentracije NP CeO<sub>2</sub> rasla i njihova toksičnost na ispitivanome organizmu. Toksičnost je rasla i sa smanjenjem veličine NP. Ispitivanje na ježincu *P. lividus*, na kojem je provedeno i ovo istraživanje, pokazalo je da NP CeO<sub>2</sub> uzrokuju slijedeće negativne učinke: smanjenje aktivnosti kolinesteraze, razine proteina HSC70 i GRP78 te su zamijećena morfološka oštećenje lizosoma. Pokazano je i da se NP CeO<sub>2</sub> bioakumuliraju u organizmu izazivajući

toksične učinke (Falugi i sur., 2012). Spomenuto je istraživanje rađeno na odraslim jedinkama. Naime, moguće je da su odrasli ježinci osjetljiviji na NP cerija od njihovih larvi koje pak zbog puno jednostavnije građe moguće vrlo brzo izbacuju NP iz organizma.

Različiti i često kontradiktorni rezultati vezani za toksične učinke mogu biti uzrokovani drugačijim karakteristikama NP cerija (dimenzija, površinski naboj, omjer površine i volumena, prisutnost omotača itd.) i različito dizajniranim eksperimentima. Usporedbu rezultata i procjenu toksičnosti dodatno otežavaju ispitivanja provedena na različitim vrstama organizama i različitim tkivima unutar iste vrste organizma.

U ovom istraživanju korištene su NP  $\text{CeO}_2$  bez omotača, što je moglo uzrokovati njihovu agregaciju i time smanjenje „nanočestičnih svojstava“. Danas se većinom proizvode i primjenjuju NP s omotačima, što sprječava njihovu agregaciju i sedimentaciju u vodenim sustavima, pa one zadržavaju svoja specifična svojstva. To može uzrokovati toksične učinke u međudjelovanju s drugim tvarima i organizmima. Upravo iz spomenutih razloga, prije općeg zaključivanja kako NP  $\text{CeO}_2$  nisu toksične, trebalo bi provesti dodatna istraživanja s najčešće primjenjivanim omotačima na različitim vrstama organizama.

## 6. ZAKLJUČAK

- Nanočestice cerija **nisu pokazale negativan učinak na embrionalni razvoj** ježinaca
- Negativan učinak nanočestica cerija nakon tretmana sperme nije uočen te je **uspješnost oplodnje bila vrlo visoka** kod sve tri ispitivane vrste ježinaca
- Sa spermijima koji su tretirani nanočesticama uspješno je obavljena oplodnja i **kvaliteta potomstva nije bila smanjena**

Testom embrionalnog razvoja ježinca provedenim na Mediteranskim vrstama ježinaca: *A. lixula*, *P. lividus* i *S. granularis*, nije se uspio dokazati negativan učinak NP CeO<sub>2</sub>. Istraživanje čiji su rezultati prikazani u ovom završnom radu ukazuju na to da NP CeO<sub>2</sub> ne predstavljaju opasnost za embrionalni razvoj ispitivanih vrsta ježinaca. Međutim, potrebno je provesti dodatna istraživanja s NP cerija na drugim modelnim organizmima i tipovima stanica pri nego što se otkloni sumnja u njihovu toksičnost.

## 7. LITERATURA

Baalousha, M., Ju-Nam, Y., Cole, P.A., Hriljac, J.A., Jones, I.P., Tyler, C.R., Stone, V., Fernandes, T.F., Jepson, M.A., Lead, J.R. (2012.) Characterization of cerium oxide nanoparticles-part 2: nonsize measurements, *Environ. Toxicol. Chem.* 31, str. 994-1003.

Bailey, D., Chow, L., Merchant, S., Kuiry, S.C., Patil, S., Seal, S., Rzigalinski, B.A. (2013.) Engineered oxide nanoparticles increase neuron allife spanin culture and act as free radical scavengers, *Nature Biotechnol.* 14, str. 112.

Baker, T.J., Tyler R.C., Galloway S.T. (2013.) Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms, *Environ. Pollut.* 186, str. 257-271.

Balaguru, R.J.B., Jayaprakash, B.G. (2014.) Introduction to Materials and Classification of Low Dimensional Materials, *NPTEL – Electrical & Electronics Engineering – Semiconductor Nanodevices*. Dostupno na: <http://nptel.ac.in/courses/115106076/Module%205/Module%205.pdf> [svibanj 2018]

Bašić, E., Jusić, S., Lozančić, Ž., Bašić, I. (2017.) Primjena nanotehnologije u pripremi vode za piće, 11th International Scientific Conference on Production Engineering Development and modernization of production, Rim, str. 585-590.

Batley, G.E., Kirby, J.K., McLaughlin, M.J. (2013.) Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. *Acc. Chem. Res.* 46 (3), str. 854-862.

Beiras, R., Fernández, N., Bellas, J., Besada, V., González-Quijano, A., Nunes, T. (2003.) Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays, *Chemosphere* 52, str. 1209-1224.

Beverly, A., Rzigalinski, B.A. (2005.) Nanoparticle and Cell Longevity, *Technology in Cancer Research & Treatment*, Volume 4, Number 6, str. 651-659

Borm, P.J. A., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J., Krutmann J., Warheit D., Oberdorster E. (2006.) The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ECETOC, *Part. Fibre Toxicol.* 3, str. 1-35.

Booth, A., Storseth, T., Altin, D., Fornara, A., Ahniyaz, A., Jungnickel H., Laux, P., Luch, A., Sorensen, L. (2015.) Freshwater dispersion stability of PAA-stabilised cerium oxide nanoparticles and toxicity towards *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Science of The Total Environment*, Vol. 505, str. 596-605.

Bottero, J.Y., Wiesner, M.R. (2010.) Considerations in evaluating the physicochemical properties and transformations of inorganic nanoparticles in water. *Nanomedicine* 5(6): str. 1009-1014.

Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E., Gauthier, L. (2015.) Toxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles at different trophic levels - Effects on diatoms, chironomids and amphibians, *Chemosphere* 120, str. 230–236.

Burić, P. (2018.) *Utjecaj srebrnih nanočestica na morske beskralježnjake: biološki učinci na modelima dagnje i ježinaca*, Doktorska disertacija. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet.

Burić, P., Jakšić, Ž., Štajner, L., Dutour Sikirić, M., Jurašin, D., Cascio, C., Calzolari, L., Lyons, D.M. (2015.) Effect of silver nanoparticles on Mediterranean sea urchin embryonal development is species specific and depends on moment of first exposure, *Mar. Environ. Res.* 111, str. 50-59.

Canesi, L., Corsi, I. (2016.) Effects of nanomaterials on marine invertebrates. *Sci. Total Environ.* 565. str. 933-940.

Cesar, A., Marín, A., Marin-Guirao, L., Vita, R., Lloret, J., DelValls, T.A. (2009.) Integrative ecotoxicological assessment of sediment in Portmán Bay (southeast Spain), *Ecotoxicol. Environ. Safety* 72, str. 1832-1841.

Christian, P., Kammer F., Baalousha M, Hofmann T. (2008.) Nanoparticles: structures, properties, preparation and behaviour in enviromental media, *Ecotoxicology* 17, str. 326–343.

Culcasi, M., Benameur, L., Mercier, A., Lucchesi, C., Rahmouni, H., Asteian, A., Casano, G., Botta, A., Kovacic, H., Pietri, S. (2012.) EPR spin trapping evaluation of ROS production in human fibroblasts exposed to nanoceria: evidence for NADPH

oxidase and mitochondrial stimulation, *Chemico- biological interactions* 199, str. 161-176.

Čižmek, I. (2016.) *Primjena nanomaterijala u strojarstvu*, Završni rad, Veleučilište u Karlovcu.

Đekić, Lj., Đukić, R., Vuleta, G. (2013.) Nanomaterijali u kozmetičkim proizvodima - opravdanost primene i bezbednost, Univerzitet u Beogradu, *Arhiv za farmaciju*, vol. 63, br. 3, str. 319-334.

Fairbairn, E.A., Kellerb, A.A., Mädler, L., Zhou, D., Pokhrel, S., Chirra, G.N. (2011), Metal oxide nanomaterials in seawater: Linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development. *J. Hazardous Mat.* 192, str. 1565-1571.

Falugi, C., Aluigi M.G., Chiantore M.C., Privitera D., Romoino P., Gatti M.A., Fabrizi A., Pinsino A., Matranga V. (2012.) Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin, *Mar. Environ. Res.* 76, str. 114-121.

Flügel, E. (2004.) Microfacies of carbonate rocks: analysis, interpretation and application. Springer, str. 556-557.

Goesmann, H., Feldmann, C. (2010.) Nanoparticulate Functional Materials, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, str. 1362–1395.

Gulicovski, J.J. (2016.) *Svojstva i primena solova cerijum(IV)-oksida sintetisanih postupkom forsirane hidrolize*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko metalurški fakultet.

Habdija, I., Primc, Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matonićkin, Kepčija, R., Vujčić, Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić, Perić, M. (2011.) *PROTISTA-PROTOZOA METAZOA-INVERTEBRATA. Strukture i funkcije*, I. izdanje, Zagreb, Alfa

Handy, R.D., Owen, R., Valsami-Jones, E. (2008.) The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterial: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs, *Ecotoxicology* 17 (5), str. 315-325.

Harrison, F.V.(1994.) Microscopic anatomy of invertebrates, Willey-Liss, New York, CA, USA

Heckert, E.G., Karakoti, A.S., Seal, S., Self, W.T. (2008.) The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials* 29, str. 2705–2709.

Heubach, D., Beucker, S., Lang-Koetz, C. (2007) Uses of Nanotechnology in Environmental Technology in Hessen: Innovation Potentials for Companies, *HA HessenAgentur*, str. 6-8.

Ispas, C., Andreescu, D., Patel, A., Goia, D.V., Andreescu, S., Wallace, K.N. (2009.) Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish, *Environ. Sci. Technol.* 43, str. 6349-6356.

Ivanković, M., (2011.) Nanomaterijali i nanoproizvodi - mogućnosti i rizici, *Polimeri*, 32: str. 23-28.

Kahru, A., Dubourguier, H. (2010.) From ecotoxicology to nanoecotoxicology, *Toxicology* 269 (2-3), str.105-119.

Korsvik, C., Patil, S., Seal, S., Self, E.T., Self, W.T. (2007.) Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles, *Chem. Comm.* 10, str. 1056-1058.

Kuddus, S.A. (2017.) Nanoceria and Its Perspective in Cancer Treatment. *J. Cancer Sci. Therapy* 9, str. 368-373.

Lead, J.R., Wilkinson, K.J. (2006.) Environmental Colloids and Particles, IUPAC Series, *Analytical and Physical Chemistry*, Volume 10, Chichester, Wiley.

Lee, S.W., Kim, S.M., Choi, J. (2009.) Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28, str. 86–91.

Lungu, M., Neculae, A., Bunoiiu, M., Biris, C. (2015.) Nanoparticles' Promises and Risks, Springer International Publishing, Switzerland.

Lyklema, J. (2005.) Fundamentals of Interface and Colloid Science IV: Particulate Colloids. London, Academic Press.

Mathiowitz, E. (2008.) Drug Delivery Systems, *Toxicol. Pathol.* 36, str. 16-20.

Matranga V., Corsi I. (2012.) Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Mar. Environ. Res.* 76, str. 32-40.

Meermann, B., Kaegi, R., Corneli G, Philippe A., Domingos R., Sivry Y., Cohen-Ofri I., Tharaud M., Troster M., Kammer F., Wagner S., Bucheli T., Gogos A., Ciglenc̃ki I., Marguš M., Serchi T., Cambier S. (2015.) Interlaboratory comparison study on Au NPs - final report, *COST 1205*.

Mesarič, T., Sepčić, K., Drobne, D., Makovec, D., Faimali, S.M., Falugi, C., Gambardella, C. (2015.) Sperm exposure to carbon-based nanomaterials causes abnormalities in early development of purple sea urchin (*Paracentrotus lividus*), *Aquat. Toxicol.* 163, str. 158-166.

Mužina, K., Guliš, M., Duplančić, M., Tomašić, V., Kurajica, S. (2018.) Nanokatalizator od cerijeva(IV) oksida dopiranog manganom pripravljen hidrotermalnom sintezom, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa. XII. SUSRET MLADIH KEMIJSKIH INŽENJERA - KNJIGA SAŽETAKA, Zagreb, str.100-100.

Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties, (2004.) *Royal Society and Royal Academy of Engineering*. Dostupno na: [https://royalsociety.org/~media/Royal\\_Society\\_Content/policy/publications/2004/9693.pdf](https://royalsociety.org/~media/Royal_Society_Content/policy/publications/2004/9693.pdf) [08.05.2018.]

Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N. (2006.) Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science* 311, str. 622-627.

Perrie, Y., Rades, T. (2012.) *Pharmaceutics, Drug Delivery and Targeting*. 2nd, Pharmaceutical Press, London.

Pinsino, A., Russo, R., Bonaventura, R., Brunelli, A., Marcomini, A., Matranga, V. (2015), Titanium dioxide nanoparticles stimulate sea urchin immune cell phagocytic activity involving TLR/p38 MAPK-mediated signalling pathway. *Sci. Rep.* 5, str. 14492-14504.



Pirmohamed, T., Dowding, T. M., Singh, S., Wasserman, B., Heckert, E., Karakoti A.S., King, J.K., Seal, S., Self, W.T. (2010.) Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity, *Chem. Comm.* 46, str. 2736–2738.

Pulit-Prociak, J., Banach, M. (2016.) Silver nanoparticles - a material of the future? *Open Chem.* 14, str. 76–91.

Rajeshkumar, S., Naik, P. (2018.) Synthesis and biomedical applications of Cerium oxide nanoparticles - A Review, *Biotechnology Reports*, Volume 17, str.1-5.

Reed, K., Cormack, A., Kulkarni, A., Mayton, M., Sayle, D., Klaessig, F., Stadler, B. (2014.) Exploring the Properties and Applications of Nanoceria: Is There Still Plenty of Room at the Bottom? *Environ. Sci.: Nano*, Issue 5, str. 390-405.

RIVM Report 2014-0157 (2014.) Assessing health & environmental risks of nanoparticles. Dostupno na:

<https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2014-0157.pdf> [10.04.2018.]

Seitz, R., Moller, B.P., Thielmann, A., Sauer, A., Meister, M., Pero, M., Kleine, O., Rohde, C., Bierwisch, A., de Vries, M., Kayser, V. (2014.) Nanotechnology in the sectors of solar energy and energy storage, *Technology Report*, str. 10.

Sellers, K., Mackay, C., Bergeson, L.L., Clough, S.R., Hoyt, M., Chen, J., Henry, K., Hamblen, J. (2008.) *Nanotechnology and the Environment*. Taylor & Francis Group, USA.

Sendra, M., Blasco, J., Araújo, V.M. (2017), Is the cell wall of marine phytoplankton a protective barrier or a nanoparticle interaction site? Toxicological responses of *Chlorella autotrophica* and *Dunaliella salina* to Ag and CeO<sub>2</sub> nanoparticles, *Ecological Indicators* XXX

Stanković, S. (2009.) *Potrošnja kisika u jajašcima hridinskog ježinca Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) prije i poslije oplodnje*, Diplomski rad, Sveučilište u Dubrovniku, Odjel za akvakulturu, diplomski studij Marikultura

Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M., Flank, A.M. (2006), Cytotoxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environ. Sci. Technol.* 40, str. 6151-6156.

Tonejc, A. (2012.) Fizika nanomaterijala, 2 Osnove kristalne strukture. Dostupno na: <http://www.phy.pmf.unizg.hr/~atonejc/FMS%20PDS%20Studij.html> [12.06.2018].

Trofimencoff, T., (2016.) Mass Production of Nanomaterials. Dostupno na: <https://www.engineering.com/DesignerEdge/DesignerEdgeArticles/ArticleID/11740/Mass-Production-of-Nanomaterials.aspx> [12.06.2018].

Tso, C., Zhung, C., Shih, Y., Tseng, Y., Wu, S., Doong, R. (2010.) Stability of metal oxide nanoparticles in aqueous solutions, *Water Sci. Technol.* 61.1, str. 127-133.

Turk, T. (2011.) Pod površinom Mediterana. Zagreb, Školska knjiga.

Van Hoecke, K., Quik, J.T., Mankiewicz-Boczek, J., De Schamphelaere, K.A.C, Elsaesser, A., Van der Meeren, P., Barnes, C., McKerr, G., Howard, C.V., Van de Meent, D., Rydzyński, K., Dawson, K.A., Salvati, A., Lesniak, A., Lynch, I., Silversmit, G., De Samber, B., Vincze, L., Janssen, C.R. (2009.) Fate and effects of CeO<sub>2</sub> nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests, *Environ. Sci. Technol.* 43, str. 4537- 4546.

Van Hoecke, K., De Schamphelaere, K.A.C., Van der Meeren, P., Smagghe, G., Janssen, C.R. (2011), Aggregation and ecotoxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength. *Environ. Pollut.* 159, str. 970-976.

Warheit, D.B., Sayes, C.M., Reed, K.L., Swain, K.A. (2008.) Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks, *Pharmacol. Therapeut.* 120, str. 35-42.

Warheit, D.B. (2008.) How Meaningful are the results of nanotoxicity, Studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol. Sci.* 101, 2, str. 183-185.

Wason, M.S., Zhao, J. (2013.) Cerium oxide nanoparticles: potential applications for Cancer and other diseases, *Am. J. Translat. Res.* 5, str.126–131.

Wehmas, L.C., Anders, C., Chess, J., Punnoose, A., Pereira, C.B., Greenwood, J.A., Tanguay, R.L. (2015), Comparative Metal Oxide Nanoparticle Toxicity Using Embryonic Zebrafish, *Toxicology Report* , str. 702-715.

White, R.H., (2013.) Nanotechnology: Risk Assessment and Management, Chesapeake AIHA/ASSE Educational Seminar, March 13.

Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Madler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J.I., Zink, J.I., Nel, A.E. (2008.) Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties, *ACS Nano* 2, str. 2121-2134.

Yokota, Y., Matranga, V., Smolencika, Z. (2002.) The Sea Urchin: From Basic Biology to Aquaculture, *CRC Press* 23, str. 3-4.

Zaštita mora - *P.lividus*, *A. lixula*, *S. granularis*, (2018.) Dostupno na:  
<http://zastitamora.net/podmorje/morske-vrste/echinodermata-bodljikasi/jezinci-echinoidea/> [15.06.2018.]

Zhang, L., Bai, R., Li, B., Ge, C., Du, J., Liu, Y., Le Guyader, L., Zhao, Y., Wu, Y., He, S., Ma, Y., Chen, C. (2011.) Rutile TiO<sub>2</sub> particles exert size and surface coating dependent retention and lesions on the murine brain, *Toxicol. Lett.* 207, str. 73-81.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

### **Utjecaj nanočestica cerija na embrionalni razvoj triju morskih ježinaca: *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis***

IVA ALAČ

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

#### **SAŽETAK**

Nanočestice cerijevog (IV) oksida (NP CeO<sub>2</sub>) imaju široku primjenu uključujući funkcionalne premaze, elektroniku, tehniku, medicinu te su prisutne u okolišu kao sekundarni produkt motora s unutarnjim izgaranjem (dodatak gorivu). Posljednje spomenuto može biti od posebne važnosti, jer se očekuje da će opterećenje okoliša proizašlo iz ispušnih plinova automobila biti značajno. Cilj ovog rada bio je ispitati potencijalnu toksičnost NP CeO<sub>2</sub> na tri vrste ježinaca: *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* i *Sphaerechinus granularis* primjenom testa embrionalnog razvoja ježinca (SUDET). Nakon izlaganja zigota koncentracijama NP CeO<sub>2</sub> u rasponu od 10 - 10 000 µg/L, embrionalni razvoj sve tri vrste se nastavio bez značajnih razlika u odnosu na kontrolni uzorak. Sperma ježinaca tretirana je s NP CeO<sub>2</sub> u koncentracijskom rasponu od 10 - 10 000 µg/L. Rezultati su pokazali da NP CeO<sub>2</sub> nisu imale negativan učinak na spermu. Naime, više od 90% jajnih stanica kod sve tri vrste bilo je uspješno oplođeno. Nadalje, tako oplođene jajne stanice uspješno su se razvile do stadija morfološki normalne larve pri svim koncentracijama, osim pri koncentraciji od 10 000 µg/L NP CeO<sub>2</sub> kada su tretirane larve vrsta *A. lixula* i *P. lividus* nakon 48 h pokazale samo 74.25 ± 8.42% i 82.25 ± 2.63% normalno razvijenih larvi. S toga, testom embrionalnog razvoja ježinaca nije dokazao da su ispitivane NP CeO<sub>2</sub> materijal zbog kojeg bi se trebalo brinuti, niti pri visokim koncentracijama. Međutim, potrebno je provesti dodatna istraživanja prije nego se zabrinutost oko nanočestica CeO<sub>2</sub> može u potpunosti otkloniti.

**Ključne riječi:**

*Arbacia lixula*, nanočestice cerijevog (IV) oksida, uspješnost oplodnje, *Paracentrotus lividus*, tretman sperme, *Sphaerechinus granularis*, SUEDT

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

dr. sc. Petra Burić

**Ocjenjivači:** doc. dr. sc. Mauro Štifanić

doc. dr. sc. Ines Kovačić

izv. prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

dr. sc. Petra Burić

**Datum obrane:** 13.07.2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula

Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

**Impact of cerium nanoparticles on the embryonic development of three sea urchin species: *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis***

IVA ALAČ

Ruđer Bošković Institute, Center for Marine Research, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

### ABSTRACT

Cerium (IV) oxide nanoparticles (NP CeO<sub>2</sub>) have a wide variety of applications including as a component in functional coating, in electronics, engineering, medicine, and are present in the environment as secondary products of combustion engines due to their use as fuel additives. It is the latter which may be of particular concern as the environmental load deriving from automobile exhaust is expected over the coming years to be significant. The aim of this work was to investigate the potential embryotoxicity of NP CeO<sub>2</sub> on three sea urchin species: *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis* using the sea urchin embryo development test (SUEDT). Embryonal development following the exposure of zygotes to NP CeO<sub>2</sub> at concentrations ranging between 10 - 10000 µg/L proceeded for all three species without significant differences compared to the control. Sea urchin sperm was treated with NP CeO<sub>2</sub> at the same concentrations as for the zygotes and results indicated that NP CeO<sub>2</sub> did not affect the fertilization ability of sea urchin sperm, with more than 90% of eggs for each species successfully fertilized. These eggs developed into morphologically normal larvae at all NP concentrations except for the 10000 µg/L NP CeO<sub>2</sub> treatment where larvae of *A. lixula* and *P. lividus* showed only 74.25 ± 8.42% and 82.25 ± 2.63% normally developed larvae after 48h, respectively. Thus, the sea urchin embryo development test did not indicate that the investigated NP CeO<sub>2</sub> is a material of concern, even at high concentrations. However, a broader range of

bioassays must be conducted before concerns about the potential toxicity of cerium oxide nanoparticles may be completely alleviated.

**Key Words:**

*Arbacia lixula*, cerium (IV) oxide nanoparticles, fertilization success, *Paracentrotus lividus*, sperm treatment, *Sphaerechinus granularis*, SUEdT

**Supervisor:** Assoc. Prof. Daniel Mark Lyons, PhD  
Petra Burić, PhD

**Reviewers:** Assist. Prof. Mauro Štifanić, PhD  
Assist. Prof. Ines Kovačić, PhD  
Assoc. Prof. Daniel Mark Lyons, PhD  
Petra Burić, PhD

**Thesis defence:** 13.07.2018.